

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA APPLICATA
XXV CICLO

“Ruolo del fegato nelle alterazioni dell’omeostasi metabolica indotte da restrizione dietetica e rialimentazione”

Coordinatore

Ch.mo Prof.

Ezio Ricca

Candidata

Dr Paola Coppola

Docente Tutor

Ch.ma Prof.ssa

Susanna Iossa

Indice

<i>Introduzione.....</i>	<i>4</i>
<i>Le fluttuazioni del peso come fattore di rischio per successive malattie metaboliche croniche.</i>	<i>7</i>
<i>Modulazione della spesa energetica durante la restrizione calorica.....</i>	<i>11</i>
<i>Redistribuzione del glucosio dal muscolo al tessuto adiposo</i>	<i>17</i>
<i>Scopo della tesi.....</i>	<i>26</i>
<i>Parte sperimentale.....</i>	<i>31</i>
<i>Animali e disegni sperimentali</i>	<i>32</i>
<i>Disegno sperimentale 1: Restrizione calorica.....</i>	<i>33</i>
<i>Disegno sperimentale 2: restrizione e rialimentazione isocalorica</i>	<i>35</i>
<i>Disegno sperimentale 3: restrizione e rialimentazione con diete ipo ed iperlipidiche.</i>	<i>37</i>
<i>Materiali e metodi</i>	<i>41</i>
<i>Bilancio energetico.....</i>	<i>42</i>
<i>Misura della composizione corporea ed epatica.....</i>	<i>44</i>
<i>Misura del consumo di ossigeno, della produzione di anidride carbonica, del quoziente respiratorio e del quoziente respiratorio non proteico</i>	<i>46</i>
<i>Determinazione dei livelli plasmatici di NEFA, glucosio, insulina e dell'indice HOMA</i>	<i>47</i>
<i>Preparazione dell'omogenato e isolamento dei mitocondri epatici.....</i>	<i>52</i>
<i>Dosaggio proteico</i>	<i>53</i>
<i>Determinazione dell'attività della FAS in omogenati di fegato</i>	<i>54</i>
<i>Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati e negli omogenati.....</i>	<i>55</i>
<i>Misura dell'accoppiamento mitocondriale</i>	<i>57</i>
<i>Misura della massa proteica mitocondriale: western blot del citocromo C</i>	<i>58</i>
<i>Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale.....</i>	<i>60</i>
<i>Determinazione dell'attività della superossido dismutasi.....</i>	<i>61</i>
<i>Analisi statistiche.....</i>	<i>62</i>

<i>Risultati</i>	64
<i>Risultati: disegno sperimentale 1: restrizione calorica</i>	65
<i>Risultati: Disegno sperimentale 2 restrizione e rialimentazione</i>	69
<i>Risultati: disegno sperimentale numero 3: rialimentazione con diete ipo e iperlipidiche</i>	73
<i>Discussione</i>	99
<i>Discussione disegno sperimentale 1: restrizione calorica</i>	100
<i>Discussione disegno sperimentale 2: restrizione e rialimentazione isocalorica</i>	105
<i>Discussione disegno sperimentale 3 restrizione e rialimentazione con diete ipo- e iperlipidiche</i>	111
<i>Conclusioni</i>	116
<i>Bibliografia</i>	120
<i>Bibliografia citata</i>	121
<i>Bibliografia consultata</i>	126

Introduzione

L'obesità è una complessa sindrome metabolica innescata da uno squilibrio tra i flussi di energia in ingresso (introduzione di alimenti) e i flussi di energia in uscita (principalmente metabolismo basale ed attività fisica), con un conseguente deposito dell'energia in eccesso sotto forma di trigliceridi nel tessuto adiposo. L'obesità è un serio problema per il mantenimento di uno stato di buona salute in quanto è frequentemente associata ad altre patologie come la resistenza all'insulina, il diabete, l'ipertensione e le malattie cardiovascolari [Blaak E, 2005]. Studi epidemiologici mostrano chiaramente che l'incidenza di questa malattia è in forte crescita non solo nel mondo occidentale, ma anche nei paesi in via di sviluppo [Elfhag & Rössner, 2005]. Cambiamenti nelle abitudini alimentari con una maggiore disponibilità di alimenti ad alta densità energetica e lo stile di vita sedentario sono considerati come principali probabili cause della dilagante epidemia di obesità.

Per limitare lo sviluppo dell'obesità e indurre il dimagrimento è necessario indurre uno stato di restrizione calorica normalmente denominato dieta dimagrante. È risaputo che dopo un periodo di limitato apporto di nutrienti e di energia, si manifesta un decremento adattativo della spesa energetica dell'intero organismo, in parte attribuibile ad un incremento dell'efficienza metabolica [Ramsey, Harper, Weindrunch, 2000]. Quest'adattamento permette all'organismo di conservare energia, rallentando così la velocità di deplezione dei depositi di grasso [Barzilai & Gabriely, 2001]. Tale

meccanismo di conservazione dell'energia, che probabilmente si è evoluto come una risposta adattativa alla sopravvivenza in periodi con limitata disponibilità di cibo, è considerato un importante fattore che contribuisce al fallimento della maggior parte dei regimi dietetici nelle terapie dimagranti. Questa riduzione adattativa della termogenesi che permette all'organismo di risparmiare energia, così diminuendo la velocità di utilizzo delle riserve energetiche corporee, persiste inoltre anche al termine della restrizione calorica per qualche tempo, permettendo all'organismo un rapido recupero delle riserve di grasso corporee [Dulloo & Girardier, 1990].

Il recupero di peso che si verifica dopo un periodo di restrizione calorica è attualmente considerato rischioso per il mantenimento dello stato di salute. Infatti, molti dati sperimentali indicano che individui nati sottopeso o che hanno sperimentato un periodo di blocco della crescita durante l'infanzia o la fanciullezza o che si sono sottoposti ad una dieta dimagrante e che hanno in seguito recuperato il peso esibiscono una maggiore suscettibilità ad obesità, diabete di tipo 2 e disturbi cardiovascolari [Dulloo et al, 2002]. La natura del legame tra recupero di peso e rischio di patologie croniche è attualmente oscura anche se dati sperimentali indicano che il periodo di recupero del peso è caratterizzato da iperinsulinemia e accelerato deposito di grasso rispetto alla massa magra. Poiché tale accumulo preferenziale di grasso si verifica anche in assenza di iperfagia, esso è considerato come la manifestazione di un aumento adattativo dell'efficienza metabolica in

risposta alla restrizione calorica. Sembra, quindi, esserci una stretta associazione tra aumentata efficienza metabolica finalizzata alla deposizione lipidica, iperinsulinemia e rischio di malattie metaboliche.

Le fluttuazioni del peso come fattore di rischio per successive malattie metaboliche croniche.

Obesità, diabete di tipo 2 ed ipertensione sono tre grandi determinanti delle malattie cardiovascolari, a lungo riconosciute come malattie tipiche dei paesi industrializzati. Esse sono il risultato della complessa interazione tra la predisposizione genetica e i fattori ambientali, con l'insulino-resistenza (la diminuita capacità dei tessuti periferici bersaglio a rispondere adeguatamente alle concentrazioni fisiologiche di insulina) come manifestazione precoce in ognuna di queste patologie [Landsberg, 1986; Neel et al, 1998]. Inoltre è ormai noto che l'obesità predispone allo sviluppo di insulino resistenza e diabete di tipo 2, ipertensione e malattie coronariche; da analisi epidemiologiche, è emerso che anche le grandi fluttuazioni del peso corporeo (sia durante la crescita o in età giovane adulta) rappresentano un ulteriore fattore di rischio per lo sviluppo di diabete di tipo 2 e patologie cardiovascolari.

E' stata registrata un'alta percentuale di morbidità e mortalità dovuta a malattie cardiovascolari in uomini e donne che hanno subito fluttuazioni del peso corporeo in giovane età [Hamm et al, 1989; Holbrook et al, 1989;

Lissner et al, 1989, 1991; Lee & Paffenbarger, 1992]. Queste correlazioni non dipendono solo dal peso in eccesso e dall'andamento del peso corporeo nel corso del tempo, e sono valide non solo per gli obesi che soffrono della sindrome dello 'yo-yo' a causa di diete, ma anche per gruppi di soggetti che, pur non essendo obesi, non riescono a mantenere costante il peso corporeo a causa di patologie croniche, come malattie gastrointestinali o alcolismo cronico. In alcuni di questi gruppi, anche un singolo ciclo di perdita di peso e successivo recupero in età adulta potrebbe essere un potenziale fattore di rischio per lo sviluppo di successive malattie coronariche [*Holbrook et al, 1989; Lissner et al, 1989*]. Forse la prova più convincente che collega le grandi fluttuazioni di peso corporeo con i rischi di malattie cardiovascolari deriva da diversi studi longitudinali che suggeriscono che nei soggetti con basso peso alla nascita e/o la cui crescita oscilla durante l'infanzia e la fanciullezza, ma che successivamente mostrano un recupero della crescita, è più elevata la suscettibilità per l'obesità centrale, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari [*Cianfarani et al, 1999; Eriksson et al, 1999; Huxley et al, 2000; Ong et al, 2000; Levy-Marchal et al, 2002*]. Ad esempio, da studi condotti in Finlandia risulta che uomini con basso peso corporeo alla nascita, ma che successivamente mostrano un recupero della crescita diventando sovrappeso durante l'infanzia, hanno un incremento della mortalità di cinque volte superiore rispetto agli uomini con un alto indice di massa corporea alla nascita ma

che mantengono un peso regolare durante l'infanzia [Eriksson et al, 1999]. Un'ulteriore prova che il recupero della crescita, pur essendo utile a breve termine, potrebbe essere dannoso a lungo termine, deriva da studi condotti in Sud Africa, Brasile, Russia e Cina suggerendo che i bambini rachitici hanno un rischio 2-8 volte maggiore di diventare sovrappeso e/o hanno una maggiore incidenza di disturbi cardiovascolari e metabolici [Levitt et al, 2000; Victora & Barros, 2001; Sawaya et al, 2003]. Inoltre, in un recente studio prospettico fatto in Cile, è stato dimostrato che la ridotta sensibilità all'insulina potrebbe essere correlata al recupero di crescita durante il 1° anno di vita in bambini nati prematuri [Soto et al, 2003], mentre in altri studi condotti in Svizzera, i bambini nati prematuri mostrano un'alterata ossidazione del glucosio già prima della pubertà [Jornayvaz et al, 2004].

Come possono tali variazioni di peso corporeo portare allo sviluppo di elevati rischi per queste malattie croniche che sono strettamente collegate alla sindrome dell' insulino-resistenza [Reaven 2005]? L'ipotesi attuale si basa sul concetto che la restrizione calorica, in particolare quando si verifica durante i periodi critici di crescita e sviluppo, può portare ad alterazioni durature della struttura e funzionalità dei tessuti e del funzionamento dei principali sistemi neuroendocrini [Hales & Barker, 2001; Young 2002]. Questi fenomeni indotti dalla restrizione calorica sebbene adattativi durante il periodo di limitata disponibilità di cibo, contribuiscono, tuttavia, all'incremento della morbidità durante la fase di

rialimentazione e il successivo recupero di peso. Qualunque sia il meccanismo, esso predispone a malattie metaboliche croniche, tuttavia, un denominatore comune in molte situazioni di grandi fluttuazioni di peso - sia durante la crescita o in età adulta - è che la massa grassa corporea viene recuperata ad una velocità sproporzionatamente più rapida di quella della massa magra, sottolineando in tal modo un legame potenzialmente fondamentale tra i processi che portano al recupero accelerato delle riserve di grasso e i maggiori rischi cardiovascolari.

Cosa si sa circa i processi che regolano il recupero di massa grassa, dopo un ritardo di crescita o perdita di peso negli adulti? E' noto che un'eccessiva introduzione di energia, detta iperfagia compensatoria, durante la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica con prodotti alimentari ricchi di grassi e carboidrati raffinati potrebbe essere implicata nello sviluppo di adiposità in eccesso, nella resistenza all'insulina e susseguente iperinsulinemia compensatoria e nell'iperattività del sistema nervoso simpatico. Tuttavia, il fenomeno del recupero di massa grassa durante la fase di rialimentazione si verifica anche in assenza di iperfagia [Dulloo *et al*, 2002], ciò sottolinea un'elevata efficienza del ripristino della massa grassa come una reazione fisiologica fondamentale in seguito al ritardo della crescita o la perdita di peso. Vi sono quindi strette associazioni tra il recupero di peso, la ripresa della crescita e l'alta efficienza metabolica tipiche della fase di rialimentazione con lo sviluppo dell'obesità e/o

complicanze legate all'insulina successive alla fase di rialimentazione. Di conseguenza, nasce la possibilità che la riduzione sostenuta della spesa energetica di per sé (a causa della ridotta termogenesi in alcuni organi/tessuti) - al fine di migliorare l'efficienza del ripristino della massa grassa - è anche coinvolta nella patogenesi di queste malattie metaboliche croniche.

Modulazione della spesa energetica durante la restrizione calorica

Studi longitudinali compiuti su soggetti umani e roditori durante periodi di restrizione calorica hanno mostrato che la riduzione della velocità metabolica basale (BMR) durante il progredire della restrizione calorica è maggiore di quanto può essere previsto dalla perdita del peso corporeo e della massa magra [Keys *et al*, 1950; Weyer *et al*, 2000]. Questa deviazione dai valori attesi nella riduzione del BMR è generalmente considerata come il risultato di un processo di regolazione che per contrastare il deficit di energia connesso con la restrizione calorica aumenta l'efficienza metabolica e di conseguenza riduce la velocità alla quale l'energia corporea è utilizzata. Tale riduzione della termogenesi, che si osserva in una fase relativamente precoce nel corso della restrizione calorica, è in primo luogo sotto il controllo del sistema nervoso simpatico (SNS) [Landsberg *et al*, 1984; Webber & Macdonald, 2000]. Tuttavia, come sottolineato in

precedenza, l'osservazione che, durante la fase di rialimentazione, il grasso corporeo viene recuperato ad una velocità sproporzionatamente più rapida di quella della massa magra suggerisce che: (i) una componente della riduzione adattativa della spesa energetica durante la perdita di peso dipende anche da segnali provenienti dai depositi di grasso che stanno diminuendo ed (ii) è proprio questa componente della riduzione adattativa della spesa energetica che persiste durante il recupero del peso al fine di accelerare il ripristino delle riserve dei depositi lipidici. Da un punto di vista fisiologico, la riduzione adattativa della spesa energetica in risposta alla restrizione calorica e alla rialimentazione può dipendere da due distinti sistemi di controllo, schematizzati in *figura 1*.

Figura 1

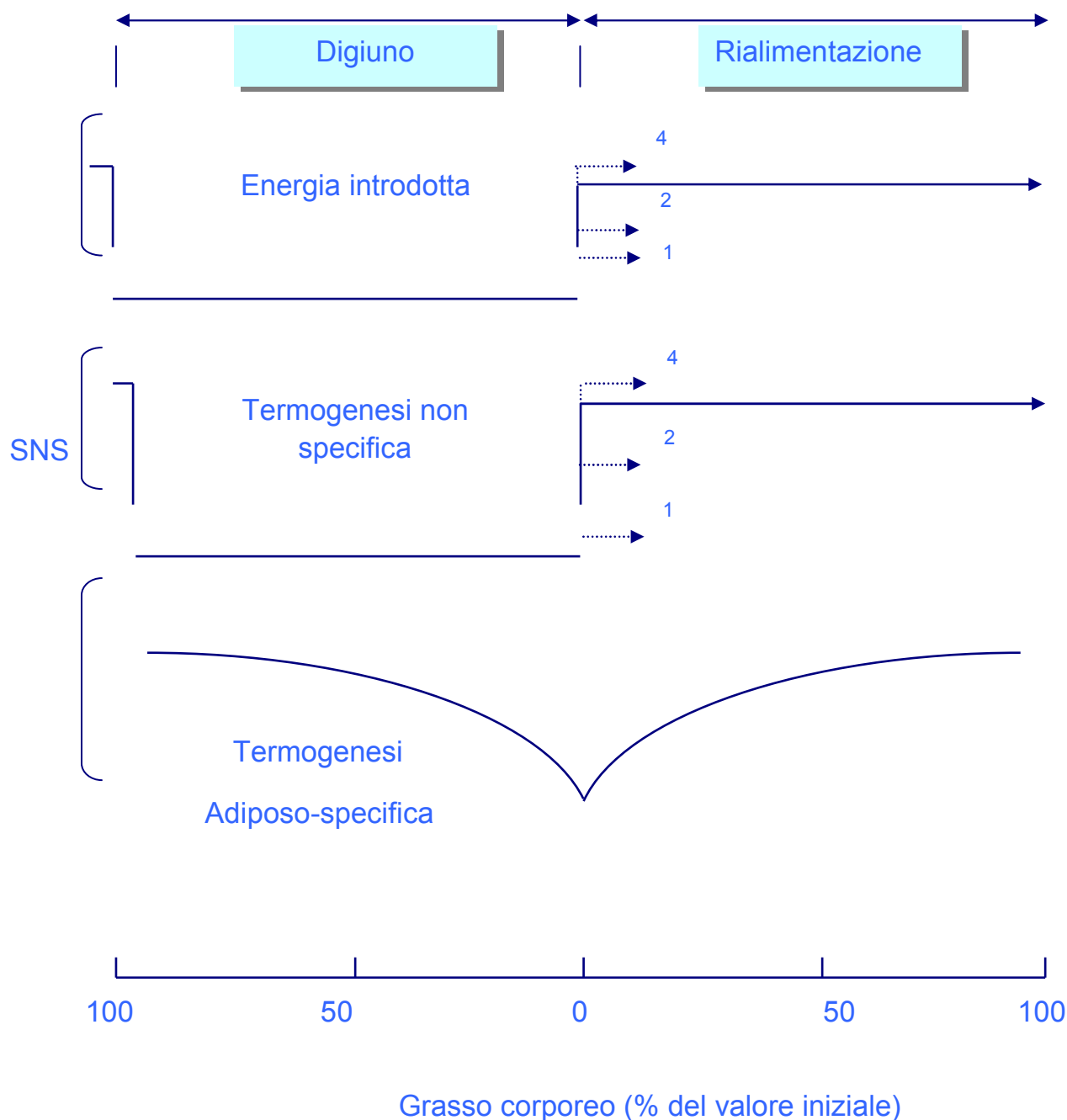


Figura 1 Rappresentazione schematica del concetto di due sistemi di controllo distinti alla base della termogenesi adattativa durante il digiuno prolungato e successiva rialimentazione, che mostra (i) il controllo della termogenesi non-specifica, che è mediato principalmente dal sistema nervoso simpatico (SNS) e che è una funzione diretta dell'approvvigionamento alimentare di energia, e (ii) il controllo della termogenesi adiposo-specifica, che è indipendente dallo stato funzionale della SNS e che è una funzione diretta dello stato di esaurimento/deplezione dei depositi di grasso.

Un sistema di controllo, denominato controllo non specifico della termogenesi, è innescato direttamente dalla diminuzione dell'energia introdotta, ma decade nel momento in cui essa aumenta, cioè nella fase di rialimentazione. Al contrario, l'altro sistema di controllo dipende dall'esaurimento delle riserve di energia corporee ed è denominato controllo adiposo-specifico della termogenesi [*Dulloo & Jacquet 2001*] e permane fin quando le riserve di energia corporee non si sono riformate, quindi, anche nella fase di rialimentazione. Inoltre, è stato mostrato che i due sistemi di controllo hanno siti effettori distinti, con il controllo adiposo-specifico della termogenesi che si verifica in siti diversi da quelli reclutati dal SNS.

Dall'analisi di dati provenienti da studi su soggetti umani riguardanti le variazioni del BMR e della composizione corporea [*Keys et al, 1950*], deriva la conferma dell'esistenza di un controllo adiposo specifico della termogenesi negli esseri umani. Studi condotti sul modello animale (roditori) hanno anche mostrato la presenza di un controllo adiposo-specifico della termogenesi [*Dulloo & Girardier, 1990; Dulloo & Jacquet, 2001*].

Un supporto all'esistenza di un sistema di controllo, che lega la deplezione dei depositi di grasso e la termogenesi soppressa nell'uomo, deriva dalla rianalisi [*Dulloo & Jacquet, 1996*] di dati longitudinali sulle variazioni della velocità metabolica basale (BMR) e della composizione corporea dal

classico "esperimento Minnesota" di semidigiuno e rialimentazione [Keys *et al*, 1950]. In questo studio, 32 uomini sani di normale peso corporeo sono stati sottoposti a 24 settimane di semidigiuno (durante le quali ognuno perse circa il 25% del peso corporeo iniziale) seguite da 12 settimane di rialimentazione ristretta con diete relativamente povere di grassi (circa il 20% dell'energia in grassi). In tale esperimento è stata riscontrata una relazione positiva tra la variazione dei depositi di grasso corporeo e la variazione della velocità metabolica basale, corretta per le perdite della massa magra e grassa. In altre parole, più è elevato il livello di deplezione dei grassi durante il digiuno, maggiore è la riduzione del BMR e di conseguenza maggiore è il grado di termogenesi soppressa. Una simile relazione è stata anche trovata dopo un periodo di 12 settimane di rialimentazione ristretta, vale a dire, inferiore è il livello di accumulo dei grassi, maggiore è la riduzione del BMR e quindi maggiore è il livello di riduzione della termogenesi [Dulloo & Jacquet, 1998]. Una simile relazione tra la termogenesi soppressa e la riduzione del grasso, durante le fasi sia di perdita che di recupero di peso, indica la presenza di un sistema di controllo a feedback negativo tra termogenesi e stato di deplezione dei depositi di grasso.

Evidenza diretta di una soppressione adiposo specifico della termogenesi, il cui ruolo è quello di accelerare specificamente il recupero di grasso corporeo, può anche essere dedotta da studi del bilancio energetico su ratti

in crescita che recuperano il peso dopo il periodo di semidigiuno. Se gli animali sottoposti a restrizione sono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli dello stesso peso, la velocità di deposizione delle proteine risulta essere la stessa dei controlli, ma quella di deposizione del grasso è incrementata più del doppio. Questo è il risultato di un dispendio energetico più basso del 10-15% durante le prime 2/3 settimane di rialimentazione isocalorica [Dulloo, & Girardier, 1990]. Diversi fattori che possono teoricamente contribuire a questa differenza della spesa energetica tra gli animali rialimentati e gli animali di controllo (differenza di età, attività fisica, modello di alimentazione) mostrano di avere un minimo impatto sulle differenze della spesa energetica tra i due gruppi. In queste condizioni di rialimentazione, quindi, la spesa energetica più bassa negli animali rialimentati è essenzialmente un risultato dell'energia risparmiata grazie alla sostenuta soppressione della termogenesi finalizzata al recupero del grasso. Questi risultati negli uomini, insieme a quelli condotti sugli animali, avvalorano l'esistenza di un sistema di controllo di autoregolazione che partecipa alla regolazione della ripresa della crescita grazie alla sostenuta soppressione della termogenesi, e suggeriscono che l'energia risparmiata in questo modo è utilizzata specificamente per il recupero della massa grassa piuttosto che per quello della massa magra.

Redistribuzione del glucosio dal muscolo al tessuto adiposo

Dato che il muscolo scheletrico è un importante sito per la conservazione dell'energia durante il digiuno [*Foster et al, 1995*], il sistema di controllo "adiposo specifico" della termogenesi può funzionare tramite collegamento retroattivo tra i depositi di trigliceridi nel tessuto adiposo e il metabolismo del muscolo scheletrico. Come mostrato in *figura 2*, il meccanismo di controllo "adiposo specifico" può comprendere un sensore(i) dello stato di deplezione (o di rallentata espansione) dei depositi di grasso, un segnale(i) che detta la soppressione della termogenesi in funzione dello stato di deplezione dei depositi di grasso, e un sistema effettore che media la termogenesi nel muscolo scheletrico [*Dulloo, 2005*]. Attualmente, la nostra comprensione dei componenti di questo meccanismo è frammentaria. Comunque, poiché il muscolo scheletrico è il maggior sito per lo smaltimento di glucosio mediato dall'insulina, una riduzione della velocità metabolica del muscolo porterebbe ad una riduzione nell'utilizzo del glucosio e quindi a iperinsulinemia. Questo nel sistema servirebbe a reindirizzare il glucosio risparmiato verso la lipogenesi de novo e il deposito di grasso nel tessuto adiposo.

Un supporto a questa ipotesi di "redistribuzione del glucosio" può essere dedotto da studi su modelli animali di recupero di grasso determinato unicamente dalla termogenesi soppressa. Questi studi mostrano che la rialimentazione con una dieta povera di grassi determina un marcato

aumento di insulina nel plasma dopo un carico di glucosio [*Crescenzo et al, 2003*], e che, in condizioni di blocco euglicemico iperinsulinemico in vivo, l'utilizzo del glucosio stimolato dall'insulina negli animali rialimentati è più basso nel muscolo scheletrico ma più alto nel tessuto adiposo bianco [*Cettour-Rose et al, 2005*]; questo risultato suggerisce uno stato di insulino resistenza nel muscolo scheletrico e di iperresponsività all'insulina nel tessuto adiposo bianco. L'attività dell'acido grasso sintasi, inoltre, maggiore nel tessuto adiposo bianco degli animali rialimentati che in quello dei controlli, suggerisce una maggiore conversione di glucosio in lipidi nei depositi di grasso del tessuto adiposo [*Cettour-Rose et al, 2005*]. In questi studi che paragonano animali rialimentati e di controllo, questa redistribuzione dell'utilizzo del glucosio dal muscolo scheletrico verso la lipogenesi de novo e i depositi di grasso nel tessuto adiposo è presente anche se non ci sono differenze tra i gruppi nell'energia introdotta, nella massa magra, nella massa grassa corporea totale e nella distribuzione localizzata di grasso o in acidi grassi liberi circolanti. Allo stesso modo, lo stato di insulino resistenza del muscolo scheletrico degli animali rialimentati non può essere attribuito al deposito dei lipidi in eccesso nelle cellule; infatti, come si evince dalla colorazione istologica, il contenuto di lipidi intramio cellulari nei muscoli degli animali rialimentati non è più alto di quello dei controlli [*Cettour-Rose et al, 2005*]. Presi insieme, questi risultati suggeriscono che la

Figura 2

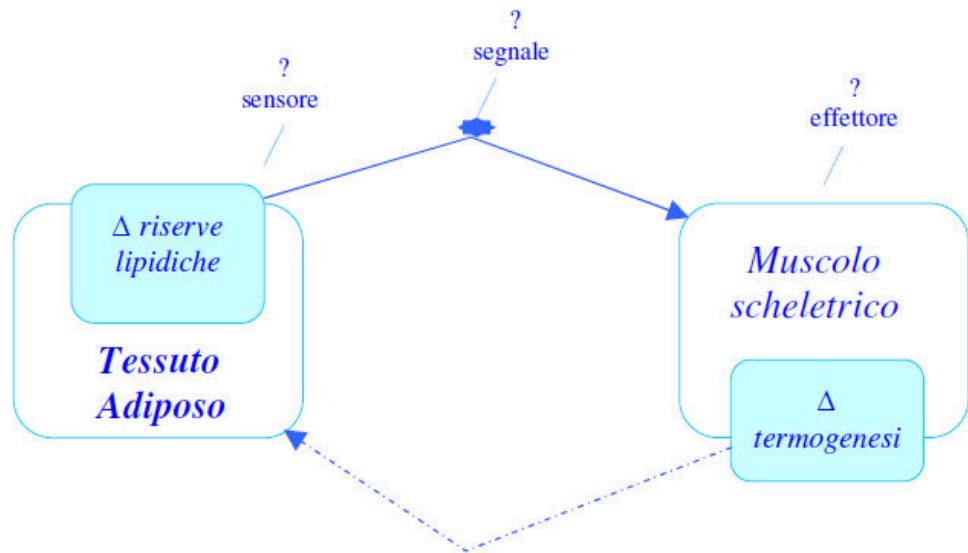


Figura 2 Rappresentazione schematica del controllo della termogenesi adiposo-specifica la cui soppressione nel muscolo scheletrico, dettata unicamente dallo stato di esaurimento e replezione delle riserve di grasso del tessuto adiposo, potrebbe essere alla base dell'elevata efficienza (e quindi la conservazione dell'energia), diretta specificamente ad accelerare il recupero di grasso o ripristino delle riserve lipidiche. Questo sistema di controllo dovrebbe quindi comprendere un sensore (s) dello stato di esaurimento delle riserve di grasso, un segnale (s) determinante la soppressione della termogenesi in funzione dello stato di esaurimento delle riserve di grasso, e un sistema effettore di mediazione per la termogenesi adattiva nel muscolo scheletrico.

resistenza all'insulina del muscolo e l'iper-responsività all' insulina del tessuto adiposo negli animali rialimentati non sono collegate a evidenti stress lipotossici, ma possono essere legate allo stato di termogenesi soppressa di per sé. In altre parole, i meccanismi che determinano la termogenesi soppressa nel muscolo scheletrico (a favore del recupero di grasso) sono correlati con quelli che inducono l'insulino resistenza durante la ripresa della crescita.

Quali siano i meccanismi molecolari che determinano questa soppressione della termogenesi, e come questi meccanismi di termogenesi soppressa possano essere connessi con il precoce sviluppo della resistenza all'insulina nel muscolo scheletrico restano, quindi, quesiti fondamentali da esaminare per migliorare la nostra comprensione di come la ripresa della crescita conferisca maggiore suscettibilità all'insulino resistenza e all'iperinsulinemia.

Dato che le concentrazioni di ormoni chiave dell'adiposità, che potrebbero fungere da collegamento tra il metabolismo del glucosio e la termogenesi nel muscolo scheletrico (cioè insulina e leptina), sono rapidamente riportate ai livelli di controllo nel passaggio da digiuno a rialimentazione [*Crescenzo et al, 2003*], l'attuale ipotesi è che la soppressione della termogenesi e la concomitante insulino resistenza nel muscolo scheletrico siano determinate dall'inibizione del meccanismo tramite il quale questi e altri ormoni interagiscono con l'attività della termogenesi nel muscolo scheletrico

[Dulloo, 2005]. La natura di questi segnali adiposo specifici ipotizzati, che inibiscono la termogenesi nel muscolo scheletrico, è ora sconosciuta, ma recenti risultati mostrano che la loro azione inibitoria sulla termogenesi muscolare potrebbe verificarsi attraverso l'interferenza con l'attività di due dei maggiori sistemi coinvolti nel metabolismo dei substrati: fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) o la proteina chinasi AMP-dipendente (AMPK). Infatti, studi ex vivo di microcalorimetria nel muscolo scheletrico intatto mostrano che i segnali della PI3K e dell'AMPK, ben conosciuti per la loro capacità di influenzare la sensibilità all'insulina in questo tessuto, sono entrambi necessari per la stimolazione ormonale della termogenesi muscolare, dato che gli effetti termogenici diretti della leptina o di ormoni rilascianti corticotropine nel muscolo scheletrico possono essere inibiti da inibitori selettivi dall'AMPK o dalla PI3K [Dulloo et al, 2002]. Sulla base di questi risultati, ne consegue che la diminuita segnalazione dell' AMPK e/o della PI3K nel muscolo scheletrico può determinare alterazioni sia dei segnali responsabili della soppressa termogenesi sia della resistenza all' insulina e alla leptina durante la ripresa della crescita. Questa ipotesi è, inoltre, supportata da risultati, provenienti da studi sperimentali di laboratorio [SummERMatter et al, 2006], che indicano una diminuita attività basale della PI3K stimolata dall'insulina nel muscolo scheletrico di ratti che mostrano recupero di grasso dovuto alla termogenesi soppressa durante la rialimentazione con una dieta povera di grassi; e in aggiunta alterazioni

nell'attivazione leptino-indotta dell' AMPK durante la rialimentazione isocalorica con diete ad elevato contenuto di acidi grassi saturi.

Solo recentemente si sta investigando su quali possano essere gli effettori molecolari della termogenesi del muscolo scheletrico sotto il controllo del segnale della PI3K e dell'AMPK, e quali fattori contribuiscano ad alterazioni così precoci in questo sistema di segnali; cioè le alterazioni che precedono l'eccesso di adiposità, di acidi grassi liberi circolanti o di lipidi intramitocellulari. Interessanti sono anche i risultati che indicano che ratti che mostrano recupero di grasso dovuto alla termogenesi soppressa mostrano anche diminuita massa mitocondriale e diminuita capacità ossidativa specificamente nel compartimento subsarcolemmatico del muscolo scheletrico [*Crescenzo et al, 2006*]. Dato l'importante ruolo che i mitocondri subsarcolemmatici hanno come supporto bioenergetico nel sistema di trasduzione e trasporto dei substrati [*Hodd, 2001*], è possibile che la deficienza in questa subpopolazione di mitocondri possa contribuire al segnale alterato della PI3K e dell' AMPK. Mentre una riduzione del numero dei mitocondri subsarcolemmatici di per sé può contribuire alla soppressione della termogenesi, che favorisce l'accumulo di grasso, alterazioni nel segnale della PI3K o dell' AMPK possono anche portare a un rallentamento di un ciclo futile dei substrati tra lipogenesi de novo e ossidazione lipidica. Questo effettore termogenico è stato recentemente coinvolto nel controllo ormonale della termogenesi del muscolo scheletrico, essendo la PI3K richiesta per

controllare il flusso di substrati attraverso la lipogenesi de novo e l'AMPK richiesta per il flusso degli acidi grassi sintetizzati "de novo" attraverso la β -ossidazione mitocondriale [Solinas *et al*, 2004].

Il significato biologico del metabolismo "risparmiatore", che sta alla base del recupero di grasso ed è caratterizzato da simultanea iperinsulinemia, insulino e leptino resistenza nel muscolo scheletrico e iper-responsività all'insulina nel tessuto adiposo, è quello di raggiungere l'omeostasi del glucosio nel sangue e il rapido riempimento dei depositi di grasso grazie al glucosio risparmiato dall'ossidazione nel muscolo scheletrico e che viene utilizzato nella lipogenesi de novo nel tessuto adiposo. Durante periodi di disponibilità di cibo alternata, frequenti nel corso dell'evoluzione dei mammiferi, questa redistribuzione del glucosio dal muscolo al tessuto adiposo probabilmente è stata importante per la sopravvivenza, perché consentiva il ripristino dei depositi di grasso non appena il cibo ritornava disponibile, ristabilendo così la capacità di sopravvivenza senza compromettere l'omeostasi del glucosio nel sangue.

Nonostante la sua natura adattativa, in uno stile di vita caratterizzato da alternanza tra carestia e periodi di elevata disponibilità di cibo, questo meccanismo potrebbe avere conseguenze deleterie nel moderno stile di vita caratterizzato da bassa attività fisica e diete ad alta densità energetica, ricche in grassi e carboidrati raffinati. Infatti, un cambiamento della dieta da carboidrati complessi a grasso animale e carboidrati raffinati porta ad

un'esacerbata soppressione della termogenesi, uno stato conclamato di iperinsulinemia, iperglicemia ed eccesso di adiposità negli animali che recuperano il peso, confrontati con animali di controllo, che crescono spontaneamente, alimentati con una quantità isocalorica della stessa dieta ricca in grassi [*Crescenzo et al, 2003*].

Si sta attualmente studiando fino a che punto quest'alterazione della glicemia risieda in un stato esacerbato di insulino resistenza del muscolo e/o nell'impossibilità del tessuto adiposo di smaltire il glucosio in eccesso risparmiato come risultato di una soppressione esacerbata della termogenesi durante la rialimentazione ad elevato contenuto di grassi. In ogni caso, qualsiasi siano le risposte a queste domande, risulta chiaro che, siccome la fase della ripresa della crescita può durare da diversi mesi a diversi anni negli uomini [*Barker et al, 2005*], la soppressione della termogenesi per risparmiare glucosio per il recupero di grasso, che porta da una parte all'insulino e leptino resistenza nel muscolo scheletrico e dall'altra all'alterata responsività all'insulina nel tessuto adiposo, instaura un fenotipo conservatore che predispone gli individui con ripresa della crescita all'insulino e leptino resistenza e a rischi per la successiva sindrome metabolica.

Sembra plausibile, alla luce di recenti risultati, che tale metabolismo energetico parsimonioso negli umani può essere programmato precocemente nella vita fetale e neonatale, e perciò durare a lungo in modo da agire oltre la

fase della ripresa della crescita. Questi risultati, infatti, indicano una minore spesa energetica a riposo (anche dopo correzione per peso, altezza o massa magra) in un gruppo di soggetti adulti con un basso peso alla nascita e una prevalenza di sindrome metabolica due volte maggiore per questi individui rispetto a quelli con un alto peso alla nascita [*Kensara et al, 2006*]. Nelle complesse interazioni tra la costituzione genetica dell'individuo, la programmazione nelle prime fasi di vita e uno stile di vita con cibi ad alta densità energetica e bassa attività fisica, il fenotipo conservatore finalizzato al recupero di grasso, che si è sviluppato per aumentare la capacità di sopravvivenza in un stile di vita cacciatore- raccoglitore caratterizzato da periodiche carenze di cibo, può diventare un evento cruciale nell'insorgenza di obesità e malattie che fanno parte della sindrome metabolica da insulino resistenza. Di conseguenza i meccanismi che determinano l'accumulo di grasso corporeo durante la prima fase di crescita sembrano importanti almeno quanto le conseguenze dell' eccesso di grassi di per sé nella patogenesi del diabete di tipo 2 e in quella delle malattie cardiovascolari.

Scopo della tesi

In risposta ad un ridotto introito calorico, la spesa energetica diminuisce in una misura che è spesso maggiore di quella che è stata predetta dalla perdita di tessuti e che è in parte attribuita ad un incremento dell'efficienza metabolica [Ramsey et al, 2000]. Questa riduzione adattativa della termogenesi, che permette all'organismo di risparmiare energia (allentando così la velocità di deplezione di depositi di massa magra e grassa) durante la restrizione calorica, persiste per diverso tempo anche durante la rialimentazione [Dulloo & Girardier, 1990], permettendo in questo modo un rapido recupero delle riserve di grasso corporeo. Questo metabolismo conservatore diretto ad un accelerato recupero di grasso, che si è evoluto in un contesto di carenza periodica di cibo, contribuisce al fallimento delle terapie dietetiche nella gestione del sovrappeso e dell'obesità nella società moderna. Inoltre, secondo studi condotti su uomini e sul modello animale, il fenomeno del preferenziale recupero di grasso funge da collegamento tra il recupero della crescita (dopo un ritardo nelle prime fasi di crescita) e un'alta predisposizione a obesità addominale, alterata tolleranza al glucosio e malattie cardiovascolari più tardi nella vita [Dulloo et al, 2002].

La ridotta spesa energetica e la soppressione adattativa della termogenesi, provocate dalla restrizione calorica, sono il risultato di cambiamenti metabolici in singoli organi e tessuti, molto probabilmente in quelli che contribuiscono maggiormente alla velocità metabolica quotidiana [Rolfe & Brown, 1997]. Infatti, recenti studi suggeriscono che il muscolo scheletrico

è coinvolto nella soppressione della termogenesi che sta alla base dell'elevata efficienza metabolica per il recupero di grasso. Ratti che mostrano il recupero di grasso esibiscono diminuita massa mitocondriale subsarcolemmatica e diminuita capacità ossidativa nel muscolo scheletrico [Crescenzo *et al*, 2003]. In vivo, inoltre, l'utilizzo del glucosio stimolato dall'insulina negli animali rialimentati che mostrano recupero di grasso è più basso nel muscolo scheletrico, ma più alto nel tessuto adiposo; ciò suggerisce una redistribuzione dell'utilizzo del glucosio dal muscolo alla lipogenesi de novo e al deposito di grasso nel tessuto adiposo [Cettour-Rose *et al*, 2005].

Un altro importante organo/tessuto che contribuisce al dispendio energetico di tutto l'organismo è il fegato. Esso ha un'elevata attività metabolica [Rolfe & Brown, 1997], che contribuisce a circa un quarto della velocità metabolica a riposo, ed è di centrale importanza per la distribuzione dei substrati energetici ai diversi tessuti.

A livello cellulare, i più importanti siti della termogenesi sono i mitocondri, che si possono considerare la centrale energetica della cellula in quanto sono deputati alla conversione dell'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Con il processo di conversione, denominato fosforilazione ossidativa, la cellula opera infatti l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno, ricavando energia. La produzione dell'energia metabolica cellulare è, quindi, essenzialmente regolata

dall'attività e dall'efficienza della fosforilazione ossidativa, che è principalmente determinata dal grado di accoppiamento tra l'ossidazione mitocondriale dei substrati energetici e la produzione di ATP. Sulla base di queste considerazioni lo scopo della mia tesi di dottorato è stato quello di individuare la misura dei cambiamenti della massa mitocondriale epatica, della capacità respiratoria e dell'efficienza in seguito ad un periodo di restrizione calorica, nonché in seguito ad un periodo di rialimentazione in seguito a restrizione calorica, per valutare il contributo del fegato alla termogenesi soppressa che guida il recupero di grasso durante la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica.

In particolare ho utilizzato tre distinti disegni sperimentali. Nel primo ho valutato gli effetti di una restrizione calorica; nel secondo ho valutato gli effetti di un periodo di rialimentazione isocalorica in seguito ad un periodo di restrizione calorica; infine, nel terzo, mediante un simile ciclo di restrizione-rialimentazione, ho tentato di individuare gli effetti di una rialimentazione ad alto contenuto lipidico per simulare gli effetti degli odierni pasti ad alto contenuto energetico, in particolare utilizzando due tipi diversi di diete: una dieta iperlipidica ricca in acidi grassi saturi, e una dieta iperlipidica ricca in acidi grassi polinsaturi.

In tutti i disegni sperimentali, ho effettuato misure del bilancio energetico e della composizione corporea negli animali sottoposti ai suddetti trattamenti. Ho, quindi, condotto una caratterizzazione metabolica dei ratti misurando i

livelli plasmatici di insulina e glucosio grazie ai quali ho potuto calcolare anche l'indice HOMA. Ho determinato il consumo di ossigeno (VO_2) degli animali nelle 24 ore e la loro produzione di anidride carbonica (VCO_2) e il quoziente respiratorio non proteico (NPRQ). Ho condotto studi incentrati sui mitocondri epatici misurando la capacità respiratoria mitocondriale sia negli omogenati di fegato che nei mitocondri isolati in presenza di substrati NAD e FAD dipendenti, ed inoltre per capire se i trattamenti effettuati, agendo sull'efficienza mitocondriale, comportassero anche variazioni della formazione di radicali liberi e quindi un aumento del danno ossidativo cellulare e o delle difese antiossidanti, ho determinato l'attività dell'aconitasi mitocondriale, un enzima del ciclo di Krebs sensibile all'esposizione ai radicali liberi, e l'attività della superossido dismutasi (SOD), uno dei sistemi utilizzati dal mitocondrio per metabolizzare i ROS.

Parte sperimentale

Animali e disegni sperimentali

Disegno sperimentale 1: Restrizione calorica

Per il disegno sperimentale 1 sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley, ottenuti dalla Charles River (Calco, Como, Italia). Un gruppo di ratti di 7 settimane d'età, del peso medio di circa 220g, è stato suddiviso in 2 sottogruppi: il primo è stato sottoposto a restrizione calorica per 2 settimane (gruppo ristretto FR); il secondo, alimentato ad libitum, rappresenta il controllo avente la stessa età dei trattati (gruppo di controllo AM). Un ulteriore gruppo di controllo, di circa 100g di peso medio e 5 settimane d'età, è stato alimentato ad libitum durante tutto il trattamento e rappresenta il controllo avente lo stesso peso dei trattati al termine del periodo restrizione (gruppo di controllo WM).

I tre gruppi di animali sono stati alimentati con un mangime standard di laboratorio in pellet (Mucedola 4RF21; Settimo Milanese, Milano), costituito dal 29% di proteine, 60% di carboidrati e 11% di lipidi.

La deficienza energetica nel gruppo di ratti FR è stata realizzata somministrando un pasto giornaliero col mangime suddetto pari al 50% di quello mediamente introdotto dal gruppo di controllo (AM). La riduzione dell'introito calorico comporta un arresto della crescita degli animali, com'è dimostrato dal fatto che al termine del periodo di restrizione il loro peso corporeo medio non è significativamente differente dal valore iniziale.

Il giorno precedente al sacrificio, su tutti i ratti sono state effettuate le misure di VO_2 e VCO_2 , del quoziente respiratorio (RQ), sono state raccolte

le urine durante le 24 ore per poterne analizzare il contenuto di azoto urinario per poter calcolare il NPRQ.

Al termine della restrizione, alcuni animali, appartenenti ad ognuno dei tre gruppi, sono stati sacrificati mediante decapitazione ed utilizzati per la misura del contenuto energetico e della composizione corporea. In particolare le carcasse dei ratti sono state autoclavate, pesate, sminuzzate e infine omogeneizzate (con una diluizione 1:2 p/v) con un omogenizzatore Polytron (circa 15000 rpm per 5 minuti/100 g di carcassa). Aliquote dell'omogenato così ottenute sono state congelate e in seguito utilizzate per le misure del contenuto energetico e della composizione corporea. Ai restanti animali è stato prelevato il fegato al fine di ottenere l'omogenato e di poterne estrarre i mitocondri, ed è stata prelevata un aliquota di sangue per la misura dell'omeostasi glicemica e per il dosaggio degli acidi grassi non esterificati (NEFA).

Disegno sperimentale 2: restrizione e rialimentazione isocalorica

Per il disegno sperimentale 2 sono stati utilizzati ratti maschi appartenenti allo stesso ceppo ed aventi la stessa età dei ratti utilizzati nel disegno sperimentale¹. I ratti sono stati suddivisi in 5 gruppi.

Due gruppi di circa 100g di peso medio sono stati alimentati ad libitum durante tutto il periodo di trattamento, e rappresentano i gruppi di controllo; gli altri tre gruppi, con peso corporeo medio di circa 232g sono stati sottoposti a restrizione calorica per due settimane. La restrizione calorica è stata realizzata in maniera identica al primo disegno sperimentale. Allo scadere della fase di restrizione, due gruppi di ratti sono stati sottoposti ad una rialimentazione isocalorica, un gruppo per un periodo di una settimana e l'altro per due settimane, somministrando agli animali una razione giornaliera, costituita da mangime standard di laboratorio, pari a quella introdotta dai rispettivi controlli alimentati ad libitum. Prima della rialimentazione, il terzo gruppo di ratti è stato sacrificato per poter determinare il contenuto energetico e la composizione corporea al termine della restrizione.

Come nel precedente disegno sperimentale, anche in questo caso il giorno precedente al sacrificio, su tutti i ratti sono state effettuate le misure di VO_2 e VCO_2 e RQ, sono state raccolte le urine durante le 24 ore per poterne analizzare il contenuto di azoto urinario per poter calcolare NPRQ.

Anche per questo disegno sperimentale, i cambiamenti nella composizione corporea sono stati determinati grazie a dei sottogruppi di animali sacrificati al termine della prima e della seconda settimana di rialimentazione isocalorica proprio per effettuare le misure del contenuto energetico e della composizione corporea. Ai restanti animali che sono stati sacrificati al termine della rialimentazione sono stati prelevati: aliquote di sangue per la misura dell'omeostasi glicemica e per il dosaggio dei NEFA, il fegato per poter effettuare i dosaggi biochimici e per la preparazione della frazione mitocondriale isolata.

Disegno sperimentale 3: restrizione e rialimentazione con diete ipo ed iperlipidiche.

Anche per il disegno sperimentale 3 sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley di 7 settimane di età e con peso corporeo medio di 232 g. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi e, come già descritto nel disegno sperimentale 1, sono stati sottoposti ad una restrizione calorica per due settimane, al termine della quale un gruppo di ratti è stato sacrificato per le misure della composizione corporea, e gli altri tre gruppi sono stati sottoposti ad un periodo di rialimentazione della durata di una settimana con quantità isocaloriche di tre distinte diete: una a basso contenuto di grassi (LF), una ad alto contenuto di lipidi provenienti da grassi animali quali il lardo (HF-L), ed un'altra dieta ad alto contenuto di lipidi provenienti dall'olio di cartamo (HF-S), che è ricco di acidi grassi insaturi, in particolare è ricco in acido linoleico (18:2 ω 6). In particolare le dosi giornaliere dei pasti forniti ai ratti sono state calcolate in modo tale che le tre dosi risultassero isoenergetiche e che quindi differissero solo per il contenuto di grassi e carboidrati mantenendo invariate la percentuale di proteine, vitamine, minerali e fibre. La composizione in nutrienti e la composizione degli acidi grassi delle diete LF, HF-L e HF-S sono riportati rispettivamente nelle *tabelle 1 e 2*.

Al termine della rialimentazione alcuni ratti sono stati sacrificati per la determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea; i

restanti animali sono stati sacrificati per realizzare le misure sui mitocondri isolati dal fegato. Come nei precedenti disegni sperimentali, anche in questo caso il giorno precedente al sacrificio, su tutti i ratti sono state effettuate le misure di $\dot{V}O_2$ e $\dot{V}CO_2$ e RQ, sono state raccolte le urine durante le 24 ore per poterne analizzare il contenuto di azoto urinario per poter calcolare NPRQ.

Anche in questo disegno sperimentale, come per i precedenti, è stata eseguita la stessa procedura sia per l'isolamento dei mitocondri che per la preparazione delle carcasse utilizzate per le misure del bilancio energetico e della composizione corporea. In tutti e tre i disegni sperimentali, i ratti sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di $24 \pm 1^\circ\text{C}$, e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Il trattamento, la stabulazione ed il sacrificio dei ratti sono stati condotti nel rispetto delle direttive del Ministero della Sanità Italiano.

Tabella 1

Composizione e contenuto energetico delle diete sperimentali.

COMPONENTI, g	LF	HF-L	HF-S
Mangime standard ¹	479	479	479
Caseina	94.5	94.5	94.5
Metionina	1	1	1
Colina	0.7	0.7	0.7
AIN vitamina mix²	3.7	3.7	3.7
AIN minerali mix³	13.4	13.4	13.4
Olio di girasole	11.7	11.7	11.7
Saccarosio	191	-	-
Glucosio	205	-	-
Lardo	-	175	-
Olio di cartamo	-	-	175
Peso totale	1000.0	779	779
Energia metabolizzabile	13980	13934	13934
Composizione in			
Proteine, J/100J	22.05	22.06	22.06
Lipidi, J/100J	7.02	54.35	54.35
Carboidrati, J/100J	70.93	23.59	23.59

1) Mucedola 4RF21; Settimo Milanese, Milano.

2) AIN = American Institute of Nutrition (1977).

3) AIN = American Institute of Nutrition (1980).

Tabella 2
Composizione in acidi grassi (g/100g di acidi grassi) delle diete
Sperimentali

Acidi Grassi	LF	HF-L	HF-S
C4:0-10:0	-	0.22	-
C12:0	-	0.22	-
C14:0	-	1.27	-
C16:0	11.92	24.45	7.55
C18:0	3.83	16.30	2.48
C20:0	0.25	-	-
C14:1ω5	-	0.48	-
C16:1ω7	0.58	2.52	0.07
C18:1ω9	27.99	39.51	14.31
C20:1ω9	1.10	1.11	0.14
C22:1ω9	0.79	0.11	0.10
C18:2ω6	51.14	12.59	73.26
C18:3ω3	2.41	1.20	2.09

*Determinati mediante GLC (Cromatografia Gas Liquida)

Materiali e metodi

Bilancio energetico

Durante il periodo di trattamento sono stati controllati sia il peso corporeo sia la quantità di cibo introdotta, sottraendo anche quella quantità eventualmente caduta durante l'introduzione del pasto. Si può in questo modo calcolare l'introito calorico lordo, ottenuto considerando il valore energetico della dieta misurato con una bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr). L'utilizzo di tale strumento ha reso possibile la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, prodotte durante tutto il periodo di trattamento: l'energia metabolizzabile introdotta si può quindi calcolare sottraendo all'introito calorico lordo il contenuto energetico delle feci e sottraendo infine un 4% di energia che si assume essere perso con le urine [Iossa *et al*, 2002].

Per effettuare le misure con la bomba calorimetrica, i campioni sono stati essiccati, ridotti in polvere e pressati al fine di ottenere pasticche di peso non superiore ai 200 mg. Per la misura ogni pasticca è stata posizionata su un piattello di platino e messa in contatto con un filo di nichel agganciato a due uncini di platino attraverso cui passa la corrente elettrica. Questo sistema viene chiuso in un recipiente d'acciaio in cui viene compresso ossigeno alla pressione di 35 atm, per rendere possibile la combustione del campione. Il calore fornito dall'ossidazione dei substrati presenti nel campione fa innalzare la temperatura di un volume noto d'acqua distillata, che circonda il recipiente d'acciaio ed è isolata dall'esterno da un

intercapedine di materiale isolante. Ogni misura può essere suddivisa in tre fasi:

- _ Una prima fase in cui viene dato alle varie parti del calorimetro il tempo di raggiungere l'equilibrio termico (T_i);
- _ Una seconda fase in cui il campione è ossidato e nel sistema si ha una variazione di temperatura (T_f);
- _ Una terza fase in cui il calorimetro raggiunge nuovamente l'equilibrio termico.

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso nell'acqua, è stato misurato l'innalzamento termico (DT), come differenza tra la temperatura massima alla combustione (T_f) e quella prima della combustione (T_i). Effettuando delle misure ripetute con pastiglie di acido benzoico secco, di cui è noto il calore specifico di combustione (26.4 KJ/g) è stata inizialmente determinata la capacità termica dell'apparecchio, dopodiché, conoscendo il peso delle pastiglie di campione e il DT prodotto dalla loro combustione, è stato calcolato il loro contenuto energetico, espresso come KJ prodotti per grammo di campione secco.

Dalle aliquote dell'omogenato di ratto che erano state preparate al momento del sacrificio dopo essiccamento, si è determinato il contenuto energetico della carcassa, sempre mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica. A questo punto è stato possibile calcolare il guadagno

energetico corporeo come differenza tra il contenuto energetico dei ratti alla fine del trattamento e quello calcolato sul gruppo di ratti sacrificati all'inizio del periodo sperimentale; la spesa energetica, in base all'equazione del bilancio energetico, è stata calcolata come differenza tra l'energia introdotta e quella guadagnata. L'efficienza metabolica lorda si è ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta.

Misura della composizione corporea ed epatica

Dall'omogenato di carcassa sono state prelevate delle aliquote per la determinazione del contenuto di acqua e lipidi. Il contenuto di acqua è stato ottenuto per differenza tra il peso delle aliquote di omogenato prima e dopo essiccamento a 60°C per 48 ore. Il contenuto lipidico è stato calcolato mediante il metodo di Folch [Folch et al, 1957], che consiste in una estrazione iniziale dei lipidi dall'omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguita da filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0.2 volumi di NaCl 0.29% e dopo un'agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo punto la fase acquosa viene aspirata con una pompa e l'interfaccia viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), con lo scopo di eliminare i

contaminanti non lipidici dall'estratto; nel passaggio successivo la fase lipidica viene versata in palloni di vetro di cui è noto il peso, per ottenere l'evaporazione dei solventi organici, mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante Heidolph. Si risale così al peso dei lipidi per grammo di carcassa e, attraverso il coefficiente 39.2 KJ/g viene convertito il contenuto lipidico in KJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi. Il contenuto proteico della carcassa è stato calcolato per differenza tra il contenuto energetico totale e quello dovuto ai lipidi. Il guadagno lipidico (o quello proteico), espresso in KJ, è stato calcolato come differenza tra l'energia depositata sotto forma di lipidi (o proteine) che è stata misurata nei ratti alla fine del trattamento e quella determinata nei ratti all'inizio del periodo sperimentale. Per determinare la composizione epatica aliquote di omogenato di fegato sono state utilizzate per la determinazione del contenuto di acqua e lipidi. Anche in questo caso, come per la carcassa, il contenuto di acqua è stato ottenuto per differenza tra il peso delle aliquote di omogenato prima e dopo essiccamento a 60°C per 48 ore; il contenuto lipidico è stato calcolato mediante il metodo di Folch [Folch et al, 1957]. Inoltre è stato saggiato anche il contenuto di glicogeno epatico mediante un dosaggio enzimatico [Roehring, 1974]. La determinazione del contenuto di glicogeno epatico è strutturata in due fasi. In una prima fase i campioni di fegato vengono acidificati in una soluzione contenente acido acetico 0,07M ad una temperatura di 55°C, e poi si aggiunge a questi l'enzima

amiloglucosidasi (3,5U/10µl) che agisce sulla catena di glicogeno liberando unità di glucosio.

Al termine della conversione del glicogeno in glucosio, si passa alla seconda fase del dosaggio, in cui si effettua la misura del glucosio utilizzando il kit commerciale (Pokler Italia) come descritto per il plasma.

Misura del consumo di ossigeno, della produzione di anidride carbonica, del quoziente respiratorio e del quoziente respiratorio non proteico

VCO_2 , VO_2 , RQ e NPRQ sono stati misurati su un periodo di 24 h utilizzando un sistema di monitoraggio (srl Panlab, Cornella, Barcellona, Spagna), costituito da un calorimetro indiretto a circuito aperto composto da quattro camere. Le misure vengono effettuate ogni 15 minuti per 3 minuti in ogni gabbia. Per la misura del NPRQ sono state raccolte le urine per l'intero periodo di 24 h, in modo da poter procedere alla determinazione dei livelli urinari di azoto mediante un metodo enzimatico/colorimetrico (FAR s.r.l., Settimo di Pescantina, Verona). L'azoto urinario ha fornito la stima della quantità in grammi di proteine ossidate tramite moltiplicazione per il fattore 6.25. Conosciuta la quantità di proteine ossidate, si è potuto calcolare la VO_2 e la VCO_2 associati all'ossidazione proteica. Sottraendo tali valori dai valori totali di VO_2 e

VCO_2 , si è giunti alla determinazione dei valori di VO_2 e VCO_2 non proteici e da questi si è potuto calcolare NPRQ riferito alle 24 h. Partendo da tale valore e con l'utilizzo di tabelle pubblicate [Elia & Livesey, 1988], è possibile ricavare il valore del bilancio dei lipidi, espresso in g/giorno, che sarà positivo o negativo a secondo che prevalga la sintesi o l'utilizzo di questo macronutriente. Conoscendo la quantità di lipidi introdotti dall'animale nel giorno in cui è stata effettuata la misura, è possibile procedere alla determinazione della lipogenesi de novo con l'utilizzo della seguente formula [Kovacs, & Westerterq-Platenga, 2006]:

bilancio dei lipidi – introito lipidico

Valori maggiori di zero saranno indicativi di una lipogenesi de novo netta.

Determinazione dei livelli plasmatici di NEFA, glucosio, insulina e dell'indice HOMA

Trascorsi 30 minuti dal prelievo, il sangue è stato posto in apposite provette addizionate con EDTA e centrifugato alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti, alla temperatura di 20°C. Applicando questa procedura è stato possibile separare il plasma, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet. I campioni di plasma sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli plasmatici di acidi grassi non esterificati

(NEFA), di glucosio, di insulina ed al calcolo dell'indice HOMA. I livelli plasmatici di glucosio e dei NEFA sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando kit commerciali (Pokler, Italia).

La concentrazione plasmatica dei NEFA viene determinata mediante l'utilizzo di un dosaggio di tipo enzimatico-colorimetrico, il quale porta alla formazione di un complesso colorato.

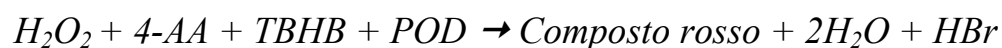
Il principio su cui si basa tale dosaggio è quello secondo cui gli acidi grassi liberi, in presenza dell'enzima Acil-CoA sintetasi (Acil CS), convertono l'ATP ed il CoA in Acil-CoA e AMP.



L'Acil-CoA prodotto durante la reazione a sua volta, in presenza dell'enzima Acil-CoA ossidasi (ACOD), reagisce con l'ossigeno per formare il 2,3 enol-CoA e perossido di idrogeno.



L' H_2O_2 risultante, in presenza della perossidasi (POD), converte l'acido 2,4,6 tribromo-3-idrossi benzoico (TBHB) e la 4-amminoantipirina (4-AA) in un composto rosso, la cui intensità di colore viene misurata a 546 nm.



L'intensità del colore del composto formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione dei NEFA nel campione.

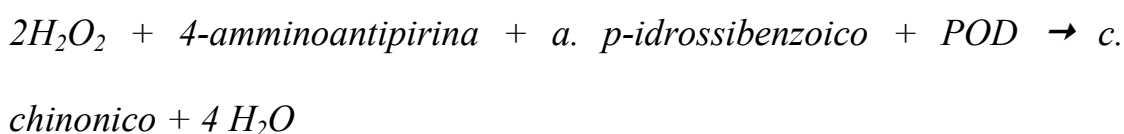
Il kit per il dosaggio è costituito da soluzioni lavoro in cui sono presenti gli enzimi necessari per le reazioni.

La concentrazione del glucosio plasmatico viene determinata mediante l'utilizzo di un dosaggio di tipo enzimatico-colorimetrico, il quale porta alla formazione di un complesso colorato.

Il principio su cui si basa tale dosaggio è quello secondo cui il glucosio, in presenza di ossigeno e di un enzima definito glucosio ossidasi (GOD), viene ossidato a gluconato con la formazione di perossido di idrogeno (H_2O_2).



A sua volta il perossido di idrogeno in presenza di un secondo enzima, definito perossidasi (POD), ossida un sistema cromogeno costituito da acido p-idrossibenzoico e 4-amminoantipirina portando alla formazione di un complesso chinonico colorato ed acqua.



L'intensità del colore del composto formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione. Il kit per il dosaggio è costituito dalla soluzione lavoro in cui sono presenti gli enzimi necessari per le reazioni e da standard di glucosio di cui si conosce la concentrazione (100 mg/ dl).

Nelle corrispettive provette si incubano 20µl di plasma per i campioni, 20µl di glucosio a concentrazione nota per gli standard e 20µl di H₂O distillata per il bianco. In tutte le provette, poi, vengono aggiunti 2ml di soluzione lavoro. Infine si incuba il tutto in un bagnetto a 37°C per 10 minuti (oppure si lascia riposare per circa 25 minuti a 25°C). A questo punto, azzerando lo spettrofotometro con il bianco, si leggono le assorbanze dei campioni e degli standard alla lunghezza d'onda di 510nm. Una volta conosciute le assorbanze dei campioni in esame e degli standard, è possibile risalire alla concentrazione del glucosio nei campioni tramite una semplice proporzione secondo cui:

$$ASS_{STAND} : [STAND] = ASS_{CAMP} : [CAMP]$$

Quindi:

$$[CAMP] = ASS_{CAMP}/ASS_{STAND} * [STAND] = \text{mg/dl}$$

Il dosaggio ELISA per l'insulina, da me utilizzato, sfrutta il metodo del doppio anticorpo (sandwich) ed utilizza come enzima coniugato la perossidasi di rafano.

Il dosaggio si articola in diverse fasi.

1. Aliquote di soluzioni a concentrazione nota di insulina (l'antigene, Ag) e campioni di plasma, sono addizionate a pozzetti sulle cui pareti è ancorato

un primo anticorpo anti-insulina (Ab1); in tale fase avviene la reazione tra Ab1 e l'Ag e quindi l'Ag viene immobilizzato sulle pareti dei pozzetti.

2. Si aggiungono a ciascun pozzetto aliquote di un altro anticorpo anti-insulina coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (Ab2), in grado di riconoscere un epitopo della molecola di insulina differente da quello riconosciuto da Ab1.

3. Incubazione: il materiale viene lasciato a temperatura ambiente. In questa fase si completa il legame tra Ab1, Ag ed Ab2 e i complessi che si formano sono indicati con il termine "sandwich".

4. Lavaggio dei pozzetti per allontanare l'Ab2 libero e successiva asciugatura.

5. Aggiunta del substrato della perossidasi, la tetrametilbenzidina (TMB) e di H_2O_2 . La TMB, in presenza di H_2O_2 , viene ossidata producendo un composto che sviluppa colore.

6. Blocco della reazione con una soluzione acida dopo un tempo stabilito. L'intensità del colore sviluppato, proporzionale alla quantità di enzima presente, può essere rilevata misurando l'assorbanza (ABS) con uno spettrofotometro. Quindi, la presenza dell'Ag è determinata in base all'attività dell'enzima.

La quantificazione della concentrazione di Ag nei sieri viene effettuata confrontando l'ABS dei pozzetti contenenti i sieri con quella di soluzioni a concentrazione nota di Ag. Infatti, riportando in grafico l'ABS delle soluzioni a concentrazione nota di insulina in funzione della concentrazione stessa si ottiene una curva di calibrazione mediante la quale è possibile determinare la concentrazione di insulina nel campione analizzato.

Il sistema omeostatico di controllo della glicemia è stato quantificato calcolando l'indice HOMA (homeostasis model assessment) con la seguente formula [Cacho et al, 2008]:

$$\text{HOMA} = \text{glicemia (mg/dL)} \times \text{insulinemia (mU/L)} / 405.$$

Preparazione dell'omogenato e isolamento dei mitocondri epatici

Il fegato prelevato dai ratti sacrificati è stato finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, e 0.1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4. I frammenti così ottenuti sono stati omogeneizzati con la stessa soluzione in un omogeneizzatore Potter Elvehjem settato a 500 rpm. L'omogenato ottenuto è stato poi filtrato attraverso una garza sterile, per allontanare residui di tessuto, aliquote del preparato sono state usate per le misure della

respirazione. L'utilizzo dell'omogenato serve a collegare la capacità ossidativa mitocondriale con l'effettiva massa delle proteine mitocondriali. Tramite una centrifugazione a 1000 g per 10 minuti, il restante omogenato è stato privato di cellule intatte e nuclei; i surnatanti ottenuti sono stati ulteriormente centrifugati a 3000 g per 10 minuti.

Il sedimento contenente i mitocondri è stato poi sospeso nella precedente soluzione e sottoposto ad altre due centrifugazioni alla stessa velocità per ottenere una frazione essenzialmente costituita da mitocondri, che è stata, infine, risospesa in un tampone contenente KCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris-P 5 mM, EGTA 1 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, a pH 7.0. Caratterizzazioni enzimatiche e microscopiche, effettuate precedentemente nel laboratorio dove ho svolto la tesi, hanno dimostrato che, questa procedura utilizzata per l'isolamento dei mitocondri (centrifugazioni a 3000 g per 10 minuti), fornisce una frazione mitocondriale che può essere considerata pura [Goglia *et al*, 1988].

Dosaggio proteico

Aliquote della frazione mitocondriale, diluite 1:100, sono state sottoposte ad un dosaggio proteico, condotto secondo il metodo di Hartree, una modifica del metodo di Lowry [Hartree, 1972], per determinare la concentrazione proteica dei mitocondri isolati. Tale dosaggio è di tipo colorimetrico, per cui determina la formazione di un colore la cui intensità

è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione. Tale metodo combina la reazione del biureto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina e dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry sta in un aumento della concentrazione di tartrato di sodio-potassio e nell'impiego di temperature più elevate (50°C). Tali variazioni rendono la metodica più sensibile e consentono una correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione proteica per un più ampio intervallo di valori di concentrazione. Lo standard utilizzato è la BSA.

Determinazione dell'attività della FAS in omogenati di fegato

La acido grasso sintasi (FAS) è un complesso multi-enzimatico capace di sintetizzare acidi grassi partendo da malonil-CoA ed acetil-CoA, attraverso una complessa serie di reazioni in cui viene ossidato il coenzima NADPH. La forma ridotta di questo coenzima presenta una banda di assorbimento con picco massimo a 340 nm, per cui l'attività specifica della FAS può essere determinata valutando la cinetica della reazione di ossidazione del NADPH mediante una lettura spettrofotometrica a tale lunghezza d'onda. Dal momento che la FAS è localizzata nel citoplasma degli epatociti, il dosaggio viene effettuato su campioni di omogenato di fegato.

In particolare, secondo il protocollo sperimentale, i campioni in esame (1,5 mg di fegato) sono stati incubati in una soluzione contenente KH_2PO_4 0.1 mM a pH 6.5, acetil-CoA 58 μ M, malonil-CoA 88 μ M e NADPH 281 μ M. Sono state, inoltre, effettuate delle misure in assenza del substrato enzimatico malonil-CoA (bianchi) per escludere un'eventuale quota di NADPH ossidato indipendentemente dalla FAS.

La lettura spettrofotometrica a 340 nm è stata effettuata ogni minuto per 6 minuti a 37°C. Quindi, in base alla velocità di ossidazione del NADPH, è stato possibile calcolare le unità enzimatiche di FAS per grammo di fegato analizzato, sapendo che una unità rappresenta la quantità di enzima che ossida 1 μ mol di NADPH in un minuto a 37°C.

Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati e negli omogenati

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati e negli omogenati di fegato è stata misurata con un metodo polarografico, realizzato attraverso l'uso dell'elettrodo ad ossigeno di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino ed un anodo di argento, immersi in una soluzione di KCl (ponte salino) e separati dalla soluzione in esame da una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al

compartimento dell'elettrodo. Quando si applica agli elettrodi un voltaggio di 0.5- 0.8 volts, l'ossigeno al catodo viene ridotto da 4 elettroni prodotti all'anodo, originando così una corrente proporzionale alla sua quantità nella soluzione in esame. La tensione d'ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi, promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark, perciò, consente di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando un mezzo di incubazione contenente: KCl 80 mM, HEPES 50 mM, K_2HPO_4 5 mM, EGTA 1 mM, 0.1% (w/v) di albumina di siero bovino (BSA) priva di acidi grassi. I mitocondri sono stati indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono stati aggiunti i substrati respiratori.

Le misure relative al consumo di ossigeno ottenute negli omogenati di fegato utilizzando substrati NAD- e FAD-dipendenti permettono di ottenere informazioni sulle variazioni della massa proteica mitocondriale e della capacità respiratoria dell'intero tessuto. Queste sono state determinate in presenza di concentrazioni saturanti di ADP (stato 3) o di oligomicina (un inibitore dell'ATP sintetasi) (stato 4).

Per valutare i cambiamenti nella capacità respiratoria specifica sono state effettuate misure dello stato 3 e 4 della respirazione nei mitocondri isolati

dal fegato. La velocità del consumo di ossigeno è stata misurata in assenza di ADP (stato 4). Aggiungendo poi l'ADP (0.6 mM) in quantità saturanti, il flusso di ioni H⁺ accoppiato al trasferimento di elettroni passerà attraverso l'ATP-sintetasi, determinando la sintesi di ATP. Si misura quindi lo stato 3 della respirazione, che rappresenta la velocità di consumo di ossigeno in condizioni attive. Il rapporto di controllo respiratorio (RCR) è calcolato come rapporto tra stato 3 e stato 4 e rappresenta un indice dell'integrità dei mitocondri. La velocità di consumo di ossigeno è stata misurata utilizzando il glutammato (10 mM) come substrato NAD dipendente, in presenza di malato (2.5 mM), ed utilizzando il palmitoilCoA (40μM) come substrato lipidico, in presenza di malato (2.5mM) e di carnitina (2mM). Il consumo di ossigeno è stato espresso in ngatomi al minuto per mg di proteine mitocondriali.

Misura dell'accoppiamento mitocondriale

Il coefficiente di accoppiamento q rappresenta l'accoppiamento tra consumo di ossigeno e produzione di ATP nella fosforilazione ossidativa e si calcola con l'equazione formulata da Cairns [Cairns *et al*, 1998]:

$$q = \sqrt{1 - (J_{sh}/J_{unc})}$$

dove J_{sh} rappresenta il consumo di ossigeno nello stato stazionario (static head condition) e si ottiene sperimentalmente dalla misura della respirazione mitocondriale in un mezzo contenente KCl 80 mM, HEPES 50 mM, EGTA

1 mM, K_2HPO_4 50 mM, pH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA libera dagli acidi grassi, e in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3.75 μ M e oligomicina 2 μ g/ml, mentre Junc rappresenta la respirazione disaccoppiata (uncoupled rate) e si ottiene dalla misura della respirazione dello stato 4 in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3.75 μ M, dopo l'aggiunta di FCCP 1 μ M, un disaccoppiante sintetico che annulla il gradiente protonico e quindi anche la sintesi di ATP a livello della membrana mitocondriale. Il grado di accoppiamento q è un parametro sempre minore di 1, inoltre può inoltre assumere diversi valori a seconda dei bisogni energetici della cellula.

Misura della massa proteica mitocondriale: western blot del citocromo C

La massa proteica mitocondriale è stata determinata mediante analisi quantitativa del citocromo c. A tale scopo, campioni di fegato sono stati denaturati in un buffer contenente Tris 60.0 mM (pH 6.8), saccarosio 10%, sodio dodecil solfato (SDS) 2%, β -mercaptoetanololo 4% e caricati su un gel SDS-poliacrilammide al 12%. Dopo la corsa elettroforetica in un buffer contenente Tris 50 mM (pH 8.3), glicina 384 mM, SDS 0.1%, il gel è stato trasferito su una membrana di polivinilidene-fluoride, PVDF (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA) a 0.8 mA/cm² per 90 minuti. La membrana è stata prebloccata mediante l'utilizzo di un buffer contenente PBS/ latte 5%/Tween 20 0.5% per un'ora (PBS: NaCl 13.7 mM, KCl 0.3 mM,

NaHPO₄ 1 mM e KH₂PO₄ 0.2 mM), quindi incubata tutta la notte a 4°C con un anticorpo primario monoclonale per il citocromo c (Biomol, Plymouth Meeting, PA), diluito 1:100 con la sopracitata soluzione. Dopo questa fase la membrana è stata lavata 3 volte per 12 minuti in PBS/0.5% Tween 20 e altre 3 volte per 12 minuti in PBS, prima di essere incubata per 90 min a temperatura ambiente con un anticorpo secondario, coniugato alla fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Sono stati eseguiti, quindi, dei lavaggi con la stessa procedura di prima e in ultimo con acqua distillata. Infine la membrana è stata incubata a temperatura ambiente con un substrato chemiluminescente, CDP-Star (Sigma-Aldrich). Per normalizzare il segnale specifico in ciascuna banda, è stata rilevata l'actina, come sopra descritto, usando un anticorpo primario policlonale (Sigma-Aldrich) e un anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina (Promega, Madison, WI). L'immunoreattività è stata visualizzata tramite chemiluminescenza enzimatica. Per evidenziare la reazione, la membrana è stata esposta ad una lastra autoradiografica (Kodak; Eastman Kodak, Rochester, NY). La lastra così impressionata è stata quindi sviluppata e fissata. I dati sono stati poi acquisiti mediante un densitometro e la quantificazione delle bande d'interesse effettuata grazie ad Un-Scan-It gel software (Silk Scientific, Orem, UT).

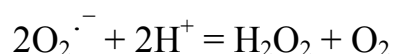
Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale

L'aconitasi, il secondo enzima del ciclo di Krebs, catalizza la interconversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad α -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto. Poichè il NADPH assorbe a 340 nm, il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente, misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto proprio alla formazione di NADPH. Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare i danni “in vivo” prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche [Gardner, 2002]. Infatti l'aconitasi è particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali ossigeno [Fridovich, 1995; Flint & Allen, 1993; Gardner et al, 1997; Drapier & Hibbs, 1996], per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi. I campioni sono stati incubati a 25°C in un buffer costituito da Tris-HCl 50mM (pH 7.4) e MnCl₂ 0.6mM, NADP⁺ 0.2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi. La misura è stata realizzata in presenza del Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. La determinazione dell'attività dell'aconitasi è stata effettuata monitorando l'assorbanza a 340 nm. L'attività dell'aconitasi è stata calcolata usando il coefficiente di estinzione molare del NADPH, $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e assumendo la conversione di una molecola di citrato in una molecola di

NADPH mediante l'isocitrico deidrogenasi. Assumendo inoltre che una unità di attività dell'aconitasi rappresenti la quantità che catalizza la conversione di 1 nmol di citrato in isocitrato al minuto, si è calcolata l'attività dell'enzima espressa come mU/mg di proteine mitocondriali.

Determinazione dell'attività della superossido dismutasi

La SOD è un enzima che catalizza la reazione:



che ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantenere bassa la concentrazione dei radicali ossigeno in diverse cellule e organelli [Fridovich & Imlay, 1991]. Il dosaggio della SOD si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del citocromo c, utilizzando il sistema xantina - xantina ossidasi come produttore di $\text{O}_2^{\cdot-}$. La SOD, competendo con i radicali $\text{O}_2^{\cdot-}$ che determinano la riduzione del citocromo C, provoca una diminuzione della velocità di riduzione del citocromo C. Il dosaggio è stato effettuato spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando il metodo descritto da Flohè ed Ötting [Flohè & Ötting, 1984].

I mitocondri, diluiti 1:10 sono stati incubati per 10 minuti in una soluzione contenente KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0.1 mM e Triton 0.2%. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla misura del campione, utilizzando un buffer costituito da KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0.1 mM, KCN 2 mM, xantina

0.1 mM, NaOH 0.1 mM, citocromo C 20 mM e 0.0033 U/ml di xantina ossidasi. È stata effettuata anche una misura della riduzione del citocromo c in un bianco, misura effettuata con tutti i reagenti tranne il campione. Si è poi costruito una curva di calibrazione in cui il reciproco delle variazioni di assorbanza al minuto del citocromo c è riportato in funzione della concentrazione di proteine del campione e si è ottenuta una relazione di tipo lineare, dalla quale è possibile ricavare l'attività del campione, espressa come Unità/mg di proteine, sapendo che una Unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo C.

Analisi statistiche

Per quanto riguarda il primo e il terzo disegno sperimentale i dati sono le medie \pm ES di sei differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute mediante l'uso delle analisi della varianza (ANOVA) a una via seguita dal post test di Tuckey.

Per il secondo disegno sperimentale i dati sono le medie \pm ES di sei differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute mediante l'uso delle analisi della varianza (ANOVA) a due vie seguita dal post test di Bonferroni.

Valori di probabilità minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi sono state effettuate usando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Risultati

Risultati: disegno sperimentale 1: restrizione calorica

In *tabella 3* sono riportate le misure della composizione corporea. I risultati mostrano che, al termine della restrizione calorica, i ratti FR hanno un contenuto energetico corporeo e massa lipidica più bassi rispetto ai controlli, mentre le proteine e l'acqua restano invariate. Per quanto riguarda il peso e la composizione degli organi, si può osservare che il fegato dei ratti FR ha valori di peso più bassi rispetto ai controlli, sia se espresso in valore assoluto, sia se espresso per 100 g di peso corporeo. Il contenuto di acqua epatica è significativamente più alto nei ratti FR rispetto ai controlli, quando è espressa per g di fegato, mentre è significativamente più bassa se espressa in funzione dell'intero organo. Inoltre, il contenuto di lipidi epatici è significativamente più basso nei ratti FR rispetto ai controlli, solo se espresso in funzione dell'intero tessuto, mentre non si riscontrano variazioni nel contenuto di glicogeno epatico.

Nella *tabella 4* sono riportati i dati relativi alla caratterizzazione metabolica ottenuta misurando i livelli plasmatici di insulina, glucosio e NEFA, nonché il valore dell'indice HOMA nei ratti FR rispetto ai due gruppi di controllo. I valori dei livelli dei NEFA e glucosio risultano significativamente più bassi nei ratti FR rispetto a quelli di controllo, mentre non vi è differenza nei livelli plasmatici di insulina. Inoltre l'indice HOMA, un indicatore dei livelli di insulino-resistenza, risulta significativamente più basso nei ratti FR rispetto ai controlli.

In *figura 3* è rappresentato il monitoraggio nelle 24h di VO_2 e di VCO_2 . Un significativo decremento della VO_2 e VCO_2 nelle 24h è stato osservato nei ratti FR rispetto ai controlli. Dalla *figura 3* si evince una significativa diminuzione sia del quoziente respiratorio (RQ) medio, sia del quoziente respiratorio non proteico (NPRQ) medio nelle 24h nei ratti FR rispetto ai due gruppi di controllo. In *figura 3* sono, inoltre, riportati i valori di RQ calcolato separatamente per la fase di luce-buio, anche in questo caso il RQ risulta più basso nei ratti FR rispetto ai controlli.

Nella *tabella 5* sono riportate le misure relative al consumo di ossigeno ottenute negli omogenati di fegato utilizzando come substrato NAD dipendente il glutammato, in presenza di malato e come substrato lipidico il palmitoil-CoA, in presenza di carnitina e malato. Tali misure consentono di ottenere informazioni sulle variazioni della capacità respiratoria dell'intero tessuto in seguito al periodo di restrizione calorica.

La respirazione nell'omogenato è stata determinata in presenza di concentrazioni saturanti di ADP (stato 3) o di oligomicina (stato 4). I risultati mostrano che lo stato 3 e lo stato 4 della respirazione, sono significativamente più alti nei ratti FR rispetto ai controlli. Non si riscontrano invece variazioni significative dei valori di RCR nei ratti FR rispetto ai controlli. Quando le capacità respiratorie mitocondriali epatiche sono espresse per 100 g di peso corporeo (*tabella 6*), i valori di stato 4 e

stato 3 ottenuti nei ratti FR sono significativamente minori rispetto ai controlli.

Per valutare i cambiamenti nella capacità respiratoria specifica dovuti alla restrizione calorica, sono state effettuate misure dello stato 3 e dello stato 4 della respirazione nei mitocondri epatici isolati. Da tali misure si evince che (*tabella 7*) non si riscontrano variazioni significative dello stato 3 e 4 della respirazione nei ratti FR rispetto ai controlli, con entrambi i substrati utilizzati. Inoltre non si registrano variazioni significative dell'RCR nei ratti FR rispetto ai controlli.

L'efficienza energetica mitocondriale è determinata misurando la respirazione in presenza di oligomicina e FCCP che induce disaccoppiamento tra consumo di ossigeno e sintesi di ATP. Nei mitocondri epatici si ha una diminuzione significativa dello Stato 4 e della respirazione disaccoppiata nei ratti FR rispetto ai controlli. Di conseguenza non si riscontrano variazioni significative del grado di accoppiamento q nei tre gruppi di ratti come si può osservare in *tabella 8*.

Per valutare variazioni della massa mitocondriale nei ratti FR, è stato utilizzato l'approccio che prevede la quantificazione del contenuto di citocromo C nell'omogenato mediante western blot. Si è verificato un aumento del contenuto di citocromo C nei ratti FR rispetto ai controlli, per cui ne consegue una massa mitocondriale epatica significativamente

incrementata nel gruppo di ratti sottoposti a restrizione calorica rispetto ai gruppi di controllo (*figura 4*).

La *tabella 9* mostra i valori delle attività specifiche dell'aconitasi e della SOD nei mitocondri epatici che sono, rispettivamente, un indice del danno ossidativo e delle difese antiossidanti della cellula. Le attività specifiche dell'aconitasi e della superossido dismutasi aumentano entrambe significativamente nei ratti FR rispetto ai controlli.

Risultati: Disegno sperimentale 2 restrizione e rialimentazione

La *tabella 10* riporta i dati della composizione corporea al termine della restrizione e dopo 1 e 2 settimane di rialimentazione isocalorica. Al termine del periodo di restrizione (tempo 0 della rialimentazione) i ratti sottoposti a restrizione mostrano peso e proteine corporee paragonabili ai ratti di controllo. In contrasto, l'energia corporea e i lipidi sono più bassi nei ratti ristretti rispetto ai controlli. Questi valori significativamente più bassi non si presentano anche al termine della prima settimana di rialimentazione isocalorica, quando i ratti rialimentati hanno una composizione corporea simile ai ratti di controllo. Alla fine della seconda settimana di rialimentazione i ratti rialimentati mostrano l'energia e lipidi corporei significativamente più alti rispetto ai controlli.

La *tabella 11* mostra i risultati del bilancio energetico nei ratti rialimentati e nei controlli durante la prima e la seconda settimana di rialimentazione e durante l'intero periodo. Dopo una settimana di rialimentazione, i ratti rialimentati mostrano un più alto guadagno lipidico ed energetico, con una spesa energetica più bassa e più alta efficienza energetica. Durante la seconda settimana di rialimentazione le differenze tra i gruppi sono meno marcate, ma viene mantenuta la significatività statistica per il guadagno lipidico e la spesa energetica. Quando il bilancio energetico viene analizzato per la durata dell'intero periodo, i ratti rialimentati mostrano: guadagno energetico, guadagno lipidico ed efficienza energetica più alti e

spesa energetica più bassa rispetto ai controlli. Non sono state trovate differenze significative tra i due gruppi per il guadagno proteico né al termine della prima settimana né al termine della seconda settimana né per l'intero periodo di rialimentazione.

La *figura 5* mostra i risultati del monitoraggio nelle 24 ore di VO_2 e VCO_2 nei ratti rialimentati e nei ratti di controllo. Si riscontrano un significativo decremento nella media delle 24 ore tra VO_2 e VCO_2 ed un significativo incremento del NPRQ sia nella prima che nella seconda settimana di rialimentazione.

In *figura 6* vengono riportati i risultati relativi al valore della lipogenesi de novo, all'attività della FAS epatica, e al contenuto epatico di lipidi. La lipogenesi de novo, calcolata utilizzando il NPRQ in accordo col metodo di Elia e Livesey [1988] risulta essere più alta nei ratti rialimentati rispetto ai controlli sia dopo la prima che dopo la seconda settimana di rialimentazione, mentre l'attività della FAS epatica è significativamente più alta dopo una settimana di rialimentazione e non si evidenziano differenze nel contenuto di lipidi epatici sia dopo una sia dopo due settimane di rialimentazione.

In *figura 7* vengono riportati i risultati relativi alle misure della massa proteica mitocondriale, misurata anche in questo caso con analisi di western blot del contenuto di citocromo C nel fegato dei ratti rialimentati e dei rispettivi controlli. Il contenuto di citocromo C risulta

significativamente più basso nei ratti rialimentati per una settimana, ma non ci sono differenze tra i ratti rialimentati per due settimane e i controlli.

Nella *tabella 12* sono riportati i risultati delle misure della capacità respiratoria mitocondriale nello stato 3 e nello stato 4 nell'omogenato di fegato, effettuate utilizzando come substrato NAD dipendente il glutammato in presenza di malato e come substrato lipidico il Palmitoil-CoA in presenza di carnitina e malato. Dalla tabella non si riscontra alcuna differenza significativa nella capacità respiratoria negli omogenati di fegato dei ratti rialimentati rispetto ai ratti di controllo. Si evidenzia, però, un aumento significativo della respirazione nello stato 3 nei mitocondri isolati (*tabella 13*) dei ratti sottoposti ad una settimana di rialimentazione, mentre non ci sono differenze tra la capacità respiratoria specifica dei ratti sottoposti a due settimane di rialimentazione e i rispettivi controlli.

Non si evidenziano variazioni significative del grado di accoppiamento “q” e della respirazione disaccoppiata tra i ratti rialimentati per una e due settimane e i relativi controlli (*tabella 14*).

In *tabella 15* sono riportati i risultati dell'aconitasi, come indicatore del danno ossidativo, e della SOD, come indice delle difese antiossidanti. I risultati mostrano che non ci sono cambiamenti significativi per quanto riguarda il danno ossidativo tra i ratti rialimentati per una e per due settimane rispetto ai controlli, mentre si evidenzia un incremento

significativo delle difese antiossidanti solo nei ratti rialimentati per una settimana rispetto ai controlli.

Risultati: disegno sperimentale numero 3: rialimentazione con diete ipo e iperlipidiche.

La *tabella 16* mostra i risultati della composizione corporea di ratti rialimentati per una settimana con diete che differiscono per il contenuto lipidico, quindi dieta a basso contenuto lipidico (LF), dieta ad alto contenuto di grassi provenienti dal lardo (HF-L), e dieta ad alto contenuto di grassi provenienti dall'olio di cartamo (HF-S). Si può osservare che i tre gruppi di animali hanno pesi corporei simili al termine della rialimentazione, ma il gruppo HF-L mostra energia e lipidi corporei significativamente più alti, e proteine corporee più basse rispetto ai controlli rialimentati con la dieta LF. Queste differenze trovate tra il gruppo HF-L paragonato al gruppo LF vengono riscontrate anche paragonando il gruppo HF-S e il gruppo LF, solo che sono meno marcate. Così, mentre l'energia e i lipidi corporei sono più alti nel gruppo HF-S rispetto al gruppo LF, i lipidi corporei sono tuttavia più bassi rispetto al gruppo HF-L. Allo stesso modo, le proteine corporee nei ratti HF-S sono più alte rispetto ai ratti HF-L. Infine, entrambi i gruppi di animali rialimentati con le diete ad alto contenuto di grassi mostrano valori di lipidi epatici significativamente più alti rispetto ai controlli LF, mentre i livelli di NEFA risultano significativamente più alti solo nel gruppo di ratti HF-L. I dati sulle misure del bilancio energetico mostrano che, malgrado non ci siano differenze nell'energia metabolizzabile tra i tre gruppi di animali, i gruppi HF-L e HF-

S hanno un guadagno energetico e lipidico più alto e un guadagno proteico più basso rispetto ai ratti di controllo LF. Paragonando, invece, i due gruppi rialimentati con le due diete ad alto contenuto lipidico si può osservare che i ratti HF-S mostrano un guadagno lipidico più basso e un guadagno proteico più alto rispetto ai ratti HF-L. Entrambi i gruppi rialimentati con le due diete ad alto contenuto lipidico mostrano valori più bassi della spesa energetica e più alta efficienza metabolica rispetto ai controlli LF, anche se i valori dei ratti HF-S sono più elevati di quelli dei ratti HF-L.

La *figura 8* mostra la misura di VO_2 e VCO_2 , risulta una diminuzione di questi parametri nei ratti HF-L e HF-S rispetto ai ratti LF e si evidenzia anche una diminuzione del NPRQ, per cui ne consegue una diminuzione della lipogenesi de novo. Inoltre, si manifesta anche un significativo decremento dell'attività della FAS epatica nei ratti HF-L e HF-S paragonati coi controlli LF (*figura 9*).

La *tabella 17* mostra i risultati relativi alla capacità respiratoria mitocondriale nello stato 3 e nello stato 4 misurata negli omogenati di fegato dei tre gruppi di animali. Si evidenzia un aumento significativo della capacità respiratoria nello stato 3 dei ratti HF-L sia rispetto ai ratti di controllo LF, sia rispetto ai ratti HF-S sia con l'utilizzo di glutammato come substrato respiratorio in presenza di malato, sia con l'utilizzo di Palmitoil-CoA in presenza di carnitina e malato. In *tabella 18* vi sono i risultati relativi alla capacità respiratoria mitocondriale nello stato 3 e nello

stato 4 misurata nei mitocondri isolati dal fegato dei tre gruppi di ratti. Dai risultati si può osservare che vi è un aumento significativo dello stato 3 della respirazione nei mitocondri dei ratti HF-L paragonati ai ratti LF e ai ratti HF-S con entrambi i substrati utilizzati.

In *tabella 19* sono riportati i risultati dell'efficienza energetica mitocondriale. Si osserva un aumento significativo della respirazione in presenza di oligomicina nei ratti rialimentati con dieta ricca di acidi grassi insaturi rispetto ai ratti rialimentati con dieta ipolipidica e con dieta ricca di acidi grassi saturi, ne consegue quindi un minor grado di accoppiamento “q”.

In *tabella 20* vengono mostrati i risultati relativi al danno ossidativo, saggiando l'attività dell'enzima aconitasi, e delle difese antiossidanti, saggiando l'attività della SOD. I risultati mostrano nessun cambiamento significativo nel danno ossidativo, ma contemporaneamente si evidenzia un decremento dell'attività della SOD e quindi delle difese antiossidanti nei ratti HF-S paragonati ai controlli LF e anche ai ratti HF-L.

Tabella 3

Composizione corporea in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Peso corporeo (g)	235 ± 2	366 ± 4*	233 ± 2
Lipidi corporei (%)	7.4 ± 0.6	9.1 ± 0.8	4.7 ± 0.3* [#]
Proteine corporee (%)	20.9 ± 0.8	19.4 ± 0.7	21.1 ± 0.5
Acqua corporea (%)	69.5 ± 3.2	66.4 ± 3.3	69.7 ± 2.8
Energia corporea (KJ/g)	7.6 ± 0.2	7.9 ± 0.3	6.6 ± 0.2* [#]
Peso del fegato (g)	11.5 ± 0.5	17.9 ± 1.1*	8.1 ± 0.2* [#]
Peso fegato (g/100g pc)	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.3	3.5 ± 0.1* [#]
Lipidi epatici (mg/g)	52 ± 6	47 ± 6	54 ± 6
Lipidi epatici (mg/fegato)	649 ± 59	841 ± 50*	453 ± 41* [#]
Acqua epatica (mg/gfegato)	723±14	738±12	815±19* [#]
Acqua epatica (mg/fegato)	8314±144	13210±122*	6601±198* [#]
Glicogeno epatico (mg/gfegato)	42±2	40±2	39±3

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica.

I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti.

* P<0.05 rispetto ai ratti WM

[#] P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 4

Livelli plasmatici di insulina, glucosio, NEFA e indice HOMA in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Insulina (ng/dl)	1.89 ± 0.47	2.02 ± 0.33	1.78 ± 0.95
Glucosio (mg/dl)	228 ± 12	222 ± 10	174 ± 15 [#]
Indice HOMA	24.8 ± 1.2	24.8 ± 0.9	17.6 ± 0.9 ^{*#}
NEFA (mmol/l)	0.107 ± 0.012	0.118 ± 0.010	0.061 ± 0.012 ^{*#}

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica.

Indice HOMA = (glucosio (mg/dl) x Insulinemia (mU/l)) /405; NEFA = acidi grassi non esterificati.

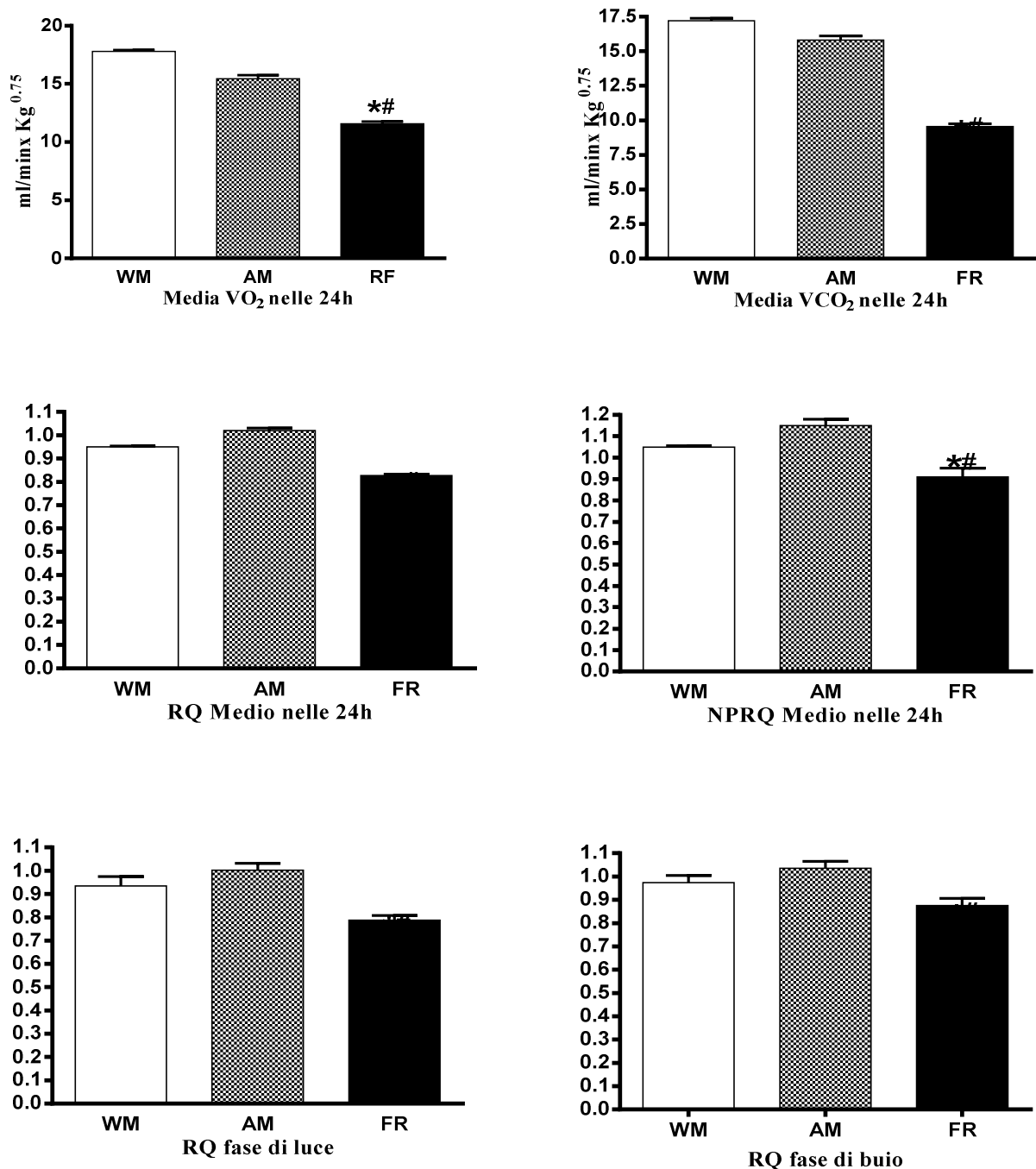
I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti.

* P<0.05 rispetto ai ratti WM

P<0.05 rispetto ai ratti AM

Figura 3

VO₂, VCO₂, RQ e NPRQ nelle 24 h in ratti sottoposti a restrizione e ratti di controllo



WM: ratti di controllo per peso
 AM: ratti di controllo per età
 FR: ratti sottoposti a restrizione
 I valori sono le medie±ES di sei diversi esperimenti
 *P<0.05 rispetto ai ratti WM
 #P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 5

Attività respiratorie mitocondriali di omogenati di fegato in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Glutammato + malato			
Stato 4	654 ± 44	693 ± 20	827 ± 29* [#]
Stato 3	6942 ± 121	6695 ± 225	8019 ± 335* [#]
RCR	10.6 ± 1.0	9.2 ± 1.0	9.7 ± 1.0
Palmitoil-CoA + carnitina + malato			
Stato 4	654 ± 16	715 ± 17	800 ± 20* [#]
Stato 3	5393 ± 133	5177 ± 96	6034 ± 207* [#]
RCR	8.2 ± 0.2	6.8 ± 0.2	7.5 ± 0.2

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica;
RCR = rapporto di controllo respiratorio.

I valori sono le medie ±ES di sei diversi esperimenti.

Lo stato 3 e lo stato 4 sono espressi come nmoli O/ min x g di tessuto.

* P<0.05 rispetto ai ratti WM

P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 6

Attività respiratorie mitocondriali epatiche espresse per 100 g di peso corporeo in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Glutammato + malato			
Stato 4	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2	2.9 ± 0.3* [#]
Stato 3	37.2 ± 2.1	32.8 ± 1.8	28.1 ± 1.3* [#]
RCR	10.6 ± 1.0	9.2 ± 1.0	9.7 ± 1.0
Palmitoil-CoA + carnitina + malato			
Stato 4	3.2 ± 0.2	3.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1* [#]
Stato 3	26.4 ± 1.2	25.4 ± 1.3	21.1 ± 1.1* [#]
RCR	8.2 ± 0.2	6.8 ± 0.2	7.5 ± 0.2

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica; RCR = rapporto di controllo respiratorio.

Lo Stato 3 e lo Stato 4 sono espressi come $\mu\text{moli O} / \text{min} \times (\text{g}/100 \text{ g pc})$.

I valori sono le medie \pm ES di sei diversi esperimenti.

*P<0.05 rispetto ai ratti WM

[#]P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 7

Attività respiratorie nei mitocondri isolati di fegato in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Glutammato + malato			
Stato 4	6.6 ± 0.4	6.0 ± 0.5	7.6 ± 0.7
Stato 3	69.6 ± 3.7	70.5 ± 4.7	66.4 ± 6.5
RCR	10.5 ± 1.0	11.8 ± 1.0	8.7 ± 1.0
Palmitoil-CoA + carnitina + malato			
Stato 4	7.9 ± 0.4	8.2 ± 0.5	10.2 ± 1.0
Stato 3	59.8 ± 3.1	58.0 ± 5.5	58.5 ± 8.6
RCR	7.6 ± 0.2	7.1 ± 0.2	5.7 ± 0.2

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica; RCR = rapporto di controllo respiratorio.

Lo Stato 3 e lo Stato 4 sono espressi come nmoli O₂/ min x mg di proteine.

I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti

*P<0.05 rispetto ai ratti WM

#P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 8

Valori di accoppiamento della fosforilazione ossidativa di mitocondri epatici in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Consumo di ossigeno			
nmol O/ (min x mg di proteine)			
+oligomicina	37.4 ± 2.4	35.4 ± 1.8	29.9 ± 0.5 ^{*#}
+ FCCP	150 ± 4	151 ± 5	122 ± 5 ^{*#}
q	0.865 ± 0.014	0.873 ± 0.012	0.860 ± 0.018

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica; q = coefficiente di accoppiamento;

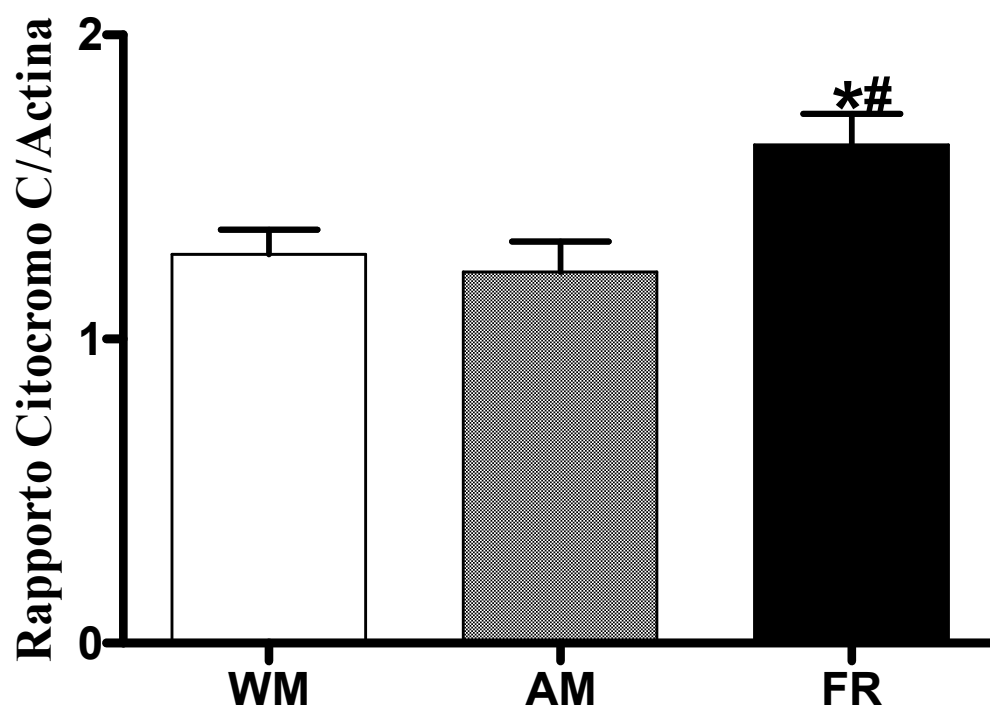
I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti

* P<0.05 rispetto ai ratti WM

P<0.05 rispetto ai ratti AM

Figura 4

Contenuto del Citocromo C in omogenati di fegato, in ratti sottoposti a restrizione calorica e ratti di controllo



WM: ratti di controllo per peso

AM: ratti di controllo per età

FR: ratti sottoposti a restrizione

I valori sono le medie \pm ES di sei diversi esperimenti

*P<0.05 rispetto ai ratti WM

#P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 9

Attività specifica dell'aconitasi e della SOD nei mitocondri di fegato in ratti sottoposti a restrizione calorica e in ratti di controllo

	WM	AM	FR
Aconitasi (mU/mg di proteine)	4.9 ± 0.5	5.1 ± 0.3	8.1 ± 0.3 ^{*#}
SOD (U/ mg di proteine)	23 ± 2	25 ± 4	37 ± 2 ^{*#}

WM = ratti di controllo per peso; AM = ratti di controllo per età; FR = ratti sottoposti a restrizione calorica;
SOD = superossido dismutasi.

I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti

* P<0.05 rispetto ai ratti WM

P<0.05 rispetto ai ratti AM

Tabella 10

Composizione corporea all'inizio e dopo 1 e 2 settimane di rialimentazione

	Settimana 0		I settimana		II settimana	
	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati
Peso corporeo (g)	225±5	229± 4	279±6	296±7	313±6	338±4
Energia corporea (KJ/g)	8.1±0.2	6.6±0.2**	8.3±0.2	8.2±0.2	8.7±0.1	9.4±0.1*
Lipidi corporei(%)	9.5±0.2	5.9±0.1**	9.7±0.3	9.9±0.4	11.0±0.3	12.9±0.3**
Proteine corporee (%)	18.2±0.5	18.3±0.4	18.9±1.0	18.4±0.6	18.6±0.4	18.1±0.7
Acqua corporea (%)	67.8±0.6	68.5±0.7	67.7±0.6	66.2±0.8	66.3±0.6	64.2±0.5

I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti.

*P<0.05 rispetto ai controlli

**P<0.001 rispetto ai controlli

Tabella 11

Bilancio energetico in ratti rialimentati e di controllo

	I settimana		II settimana		2 settimane	
	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati
ME introdotta (KJ)	2374±60	2302±38	2156±136	2114±63	4530±121	4415±39
Guadagno energetico (KJ)	532±58	917±84*	508±55	731±112	1011±71	1655±83**
Guadagno lipidico (KJ)	248±46	614±58**	368±50	566±58*	569±50	1186±58**
Guadagno proteico (KJ)	306±65	300±54	164±42	165±42	463±36	465±65
Spesa Energetica (KJ)	1841±55	1384±111**	1688±59	1383±80*	3519±87	2761±51**
Efficienza Lorda (%)	22±2	40±4**	25±3	34±2	22±2	37±2**

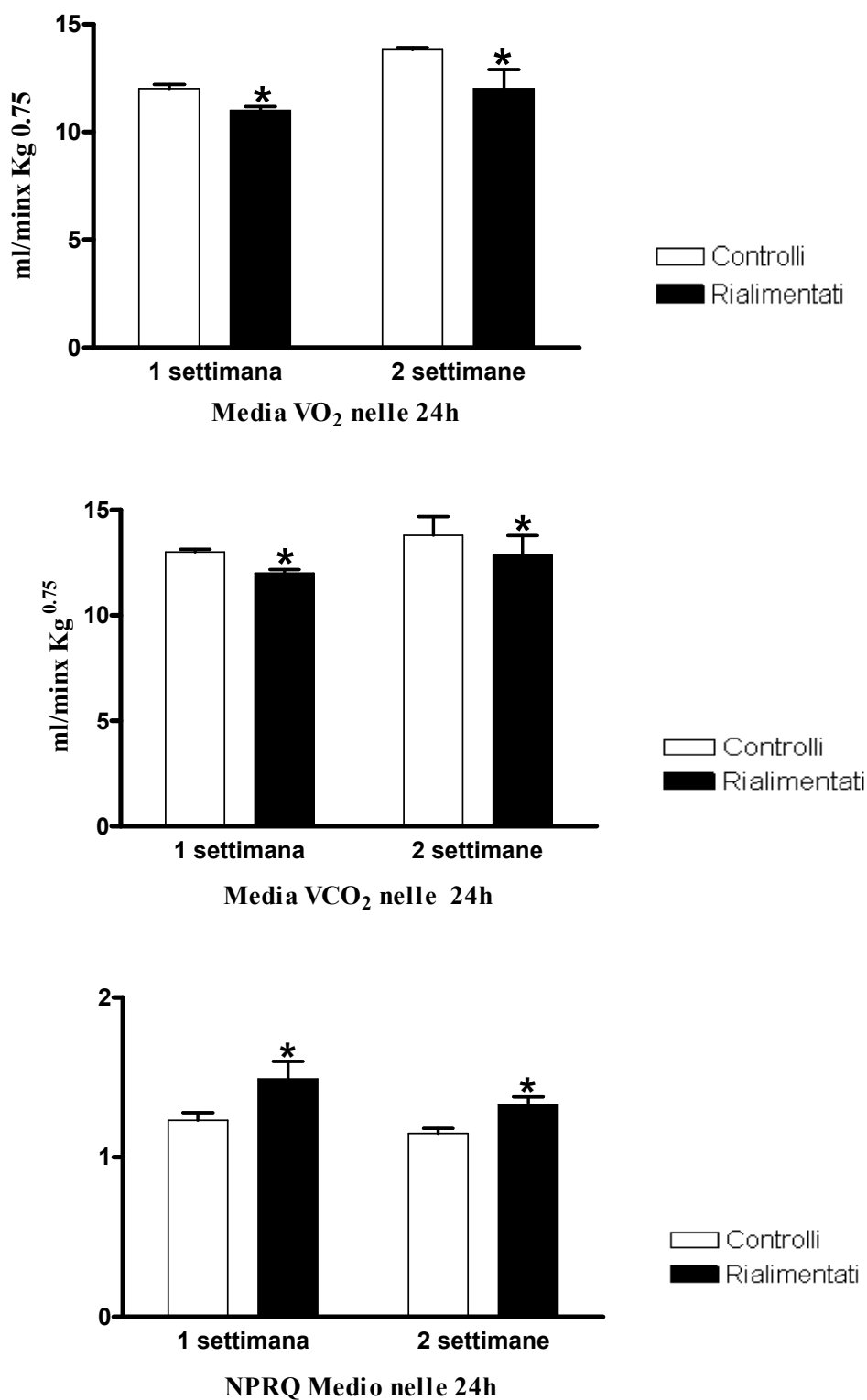
I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti.

*P<0.05 rispetto ai controlli

** P<0.001 rispetto ai controlli.

Figura 5

VO₂ e VCO₂ riferiti alle 24h e NPRQ in ratti rialimentati e ratti di controllo

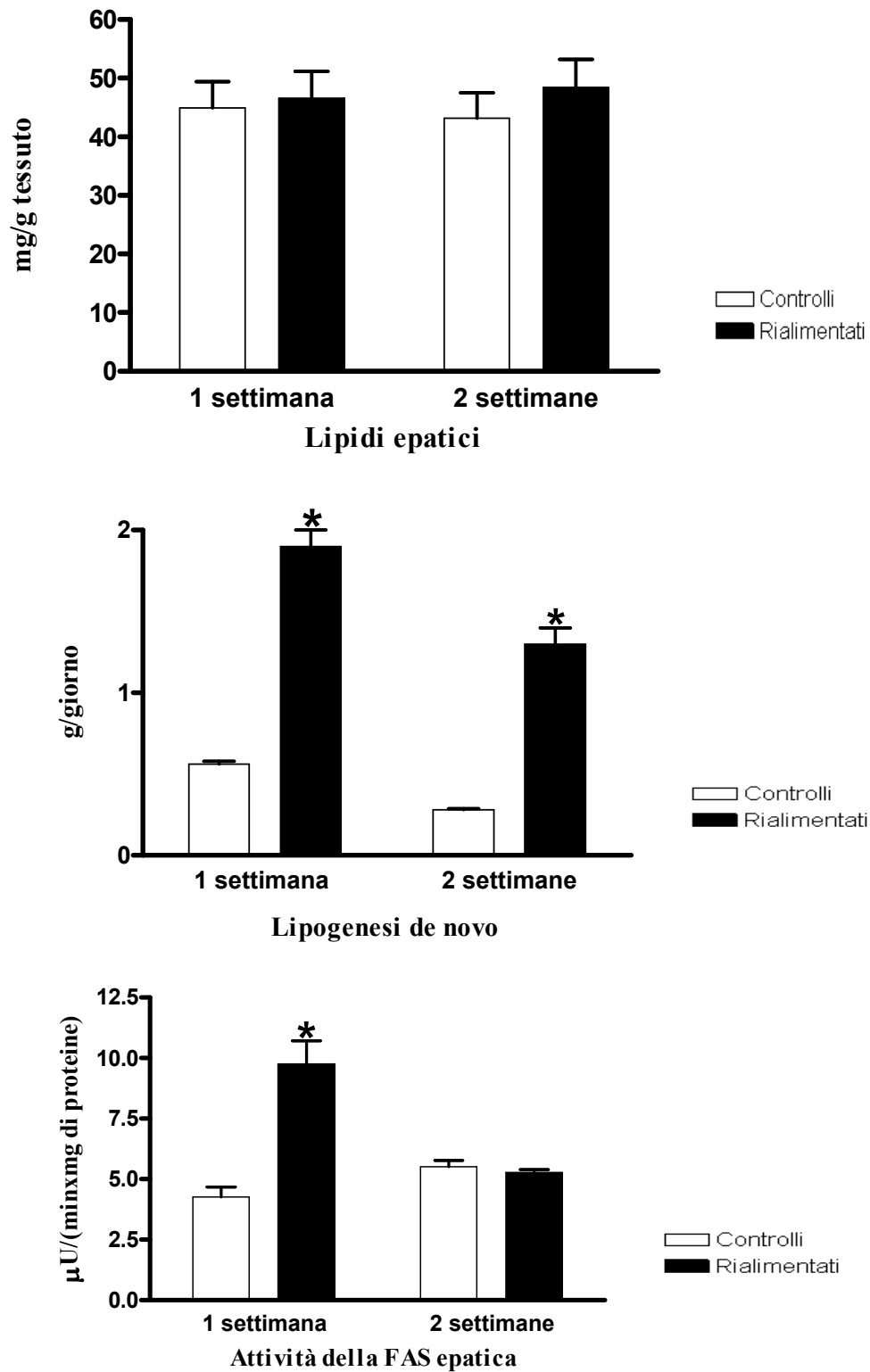


I valori sono le medie \pm ES di sei diversi esperimenti.

*P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 6

Contenuto lipidico epatico, velocità della lipogenesi de novo e attività della FAS epatica in ratti rialimentati e ratti di controllo

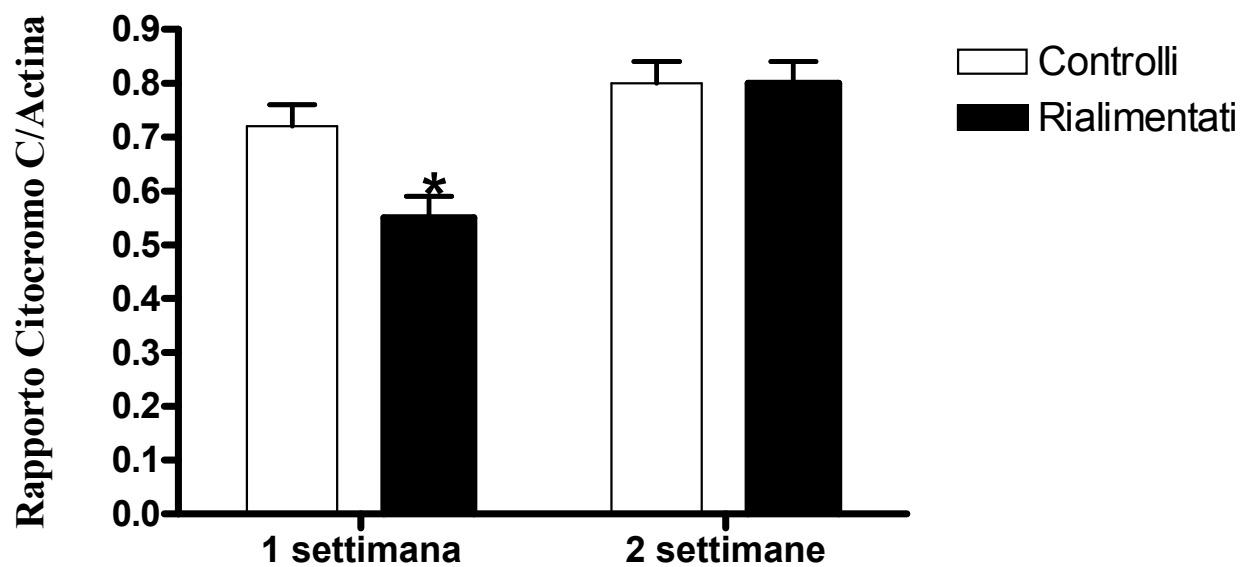


I valori sono le medie \pm ES di sei diversi esperimenti.

*P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 7

Contenuto proteico di Citocromo C in omogenati di fegato di ratti rialimentati e ratti di controllo



I valori sono le medie \pm ES di sei diversi esperimenti.

* $P < 0.05$ rispetto ai controlli

Tabella 12

Respirazione mitocondriale negli omogenati di fegato dopo 1 e 2 settimane di rialimentazione

	I settimana		II settimana	
	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati
Glutammato +malato				
Stato 3	7676.0±285.8	7965.3±237.7	7351.3±447.8	7057.7±286.3
Stato 4	663.8±39.3	590.8±25.6	575.5±41.0	697.2±56.9
RCR	11.6±0.9	13.6±0.8	12.9±0.7	10.4±0.7
Palmitoil-CoA+carnitina+malato				
Stato 3	6074±410.9	6399.0±246.5	5624.8±143.6	5562.5±228.0
Stato 4	679.2±30.5	687.0±30.4	598.6±34.6	614.8±29.4
RCR	8.9±0.7	9.4±0.5	9.5±0.4	9.2±0.6

I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti e sono espressi come ng atomi di ossigeno x min⁻¹ x g⁻¹ di tessuto.

Tabella 13

Respirazione mitocondriale nei mitocondri isolati dopo 1 e 2 settimane di rialimentazione

	I settimana		II settimana	
	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati
Glutammato +malato				
Stato 3	104.7±6.1	125.2±3.4*	128.2±6.5	119.1±5.0
Stato 4	11.6±0.9	13.3±0.3	13.5±0.6	12.3±0.9
RCR	9.7±0.6	9.1±0.4	9.6±0.7	10.0±0.9
Palmitoil-CoA+carnitina+malato				
Stato 3	95.2±5.4	110.6±1.7*	112.2±8.0	107.6±7.5
Stato 4	13.7±0.5	15.1±1.0	15.3±0.9	15.4±10.6
RCR	7.3±0.5	7.2±0.4	7.4±0.6	7.1±0.7

I valori sono le medie ± SEM di sei diversi esperimenti e sono espressi come ng atomi di ossigeno x min⁻¹ x mg proteine⁻¹.

*P<0.05 rispetto ai controlli

Tabella 14

Valori di accoppiamento della fosforilazione ossidativa di mitocondri epatici in ratti rialimentati e in ratti di controllo

	1 settimana		2 settimane	
	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati
Consumo di ossigeno nmol O/ (min x mg di proteine)				
Oligomicina	32±1	33±1	31±1	31±1
FCCP	183±3	186±4	187±3	179±4
q	0.908±0.002	0.907±0.003	0.913±0.003	0.909±0.002

q = coefficiente di accoppiamento.

I valori sono riportati come medie ± ES di sei diversi esperimenti.

Tabella 15

Attività degli enzimi aconitasi e SOD in mitocondri di fegato di ratti rialimentati per 1 settimana e per 2 settimane e ratti di controllo.

	1 settimana		2 settimane	
	Controlli	Rialimentati	Controlli	Rialimentati
Aconitasi (mU/mg prot)	7.3±0.2	8.8±0.5	7.3±0.3	8.0±0.3
SOD (U/mg prot)	15.0±1.6	22.8±2.2*	24.9±2.3	19.7±2.8

SOD: superossido dismutasi.

I valori sono le medie ± ES di sei diversi esperimenti.

*P<0.05 rispetto ai controlli

Tabella 16

Composizione corporea, bilancio energetico e livelli di NEFA plasmatici in ratti rialimentati con diete ipo-e iperlipidiche.

	LF	HF-L	HF-S
Peso corporeo, g	272±2	273±6	277±6
Energia corporea, KJ/g	8.8±0.1	9.7±0.1*	9.4±0.2*
Lipidi corporei, %	12.7±0.6	17.3±0.4*	15.1±0.3 ^{*#}
Proteine corporee, %	16.3±0.5	14.2±0.5*	15.3±0.3
Acqua corporea, %	64.3±0.7	61.5±0.5	63.0±0.3
Lipidi epatici, mg/g	41.7±1.1	58.8±5.0*	61.9±3.7*
NEFA plasmatici, mmol/L	0.369±0.020	0.544±0.010*	0.393±0.021 [#]
ME introdotta, KJ	2319±24	2296±16	2290±33
Guadagno energetico, KJ	1099±34	1490±83*	1315±57*
Guadagno lipidico, KJ	910±70	1397±30*	1200±47 ^{*#}
Guadagno proteico, KJ	197±15	93±6*	124±8 ^{*#}
Spesa energetica, KJ	1220±46	806±98*	975±61 ^{*#}
Efficienza metabolica, %	45±2	65±2*	57±2 ^{*#}

LF: ratti alimentati con dieta ipolipidica.

HF-L: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi saturi.

HF-S: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi polinsaturi.

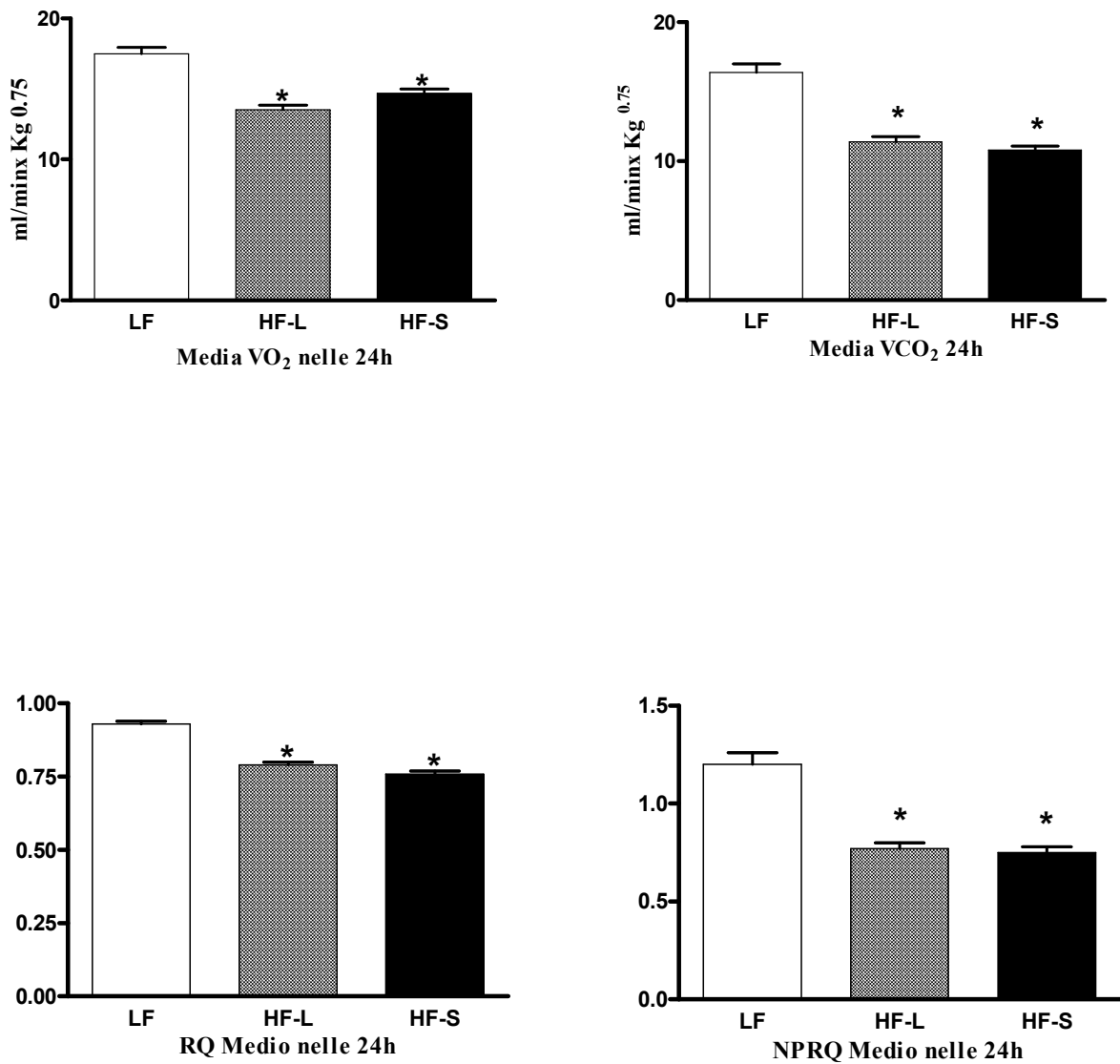
I valori sono riportati come medie ± ES di sei diversi esperimenti.

* P<0.05 rispetto ai ratti LF

P<0.05 rispetto ai ratti HF-L

Figura 8

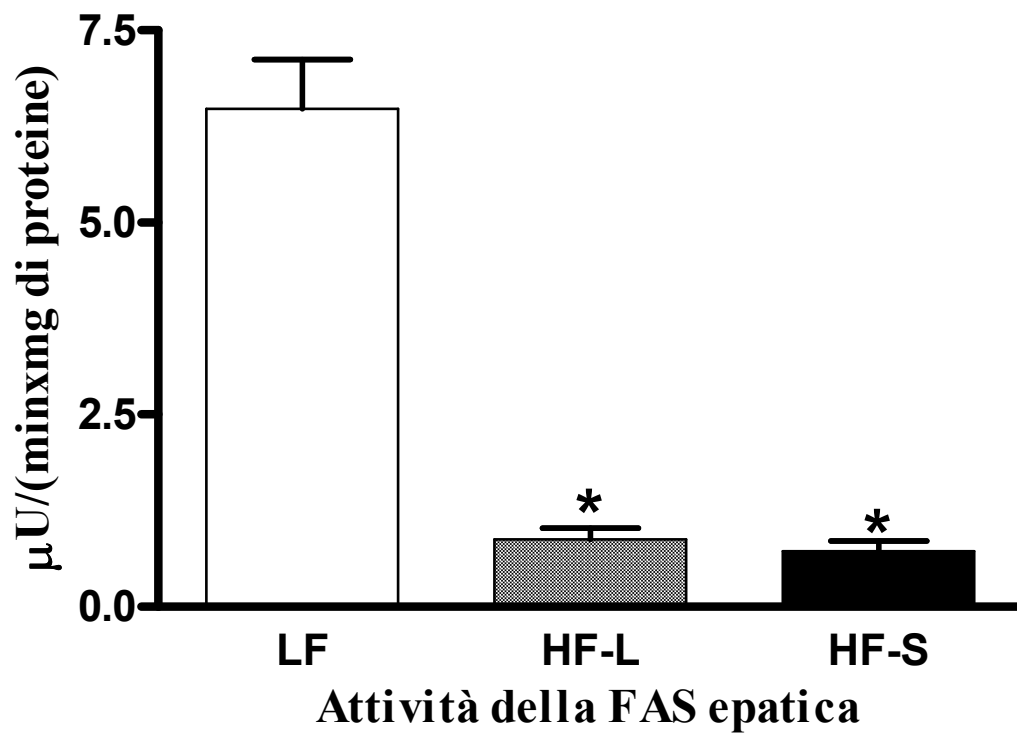
VO₂, VCO₂, RQ e NPRQ nelle 24h in ratti rialimentati con diete ipolipidiche e iperlipidiche



LF: ratti alimentati con dieta ipolipidica
 HF-L: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi saturi
 HF-S: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi polinsaturi
 I valori sono le medie±ES di sei diversi esperimenti
 *P<0.05 rispetto ai ratti LF

Figura 9

Attività della FAS epatica in ratti rialimentati con diete ipo- e iperlipidiche



LF: ratti alimentati con dieta ipolipidica

HF-L: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi saturi

HF-S: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi insaturi

I valori sono le medie \pm ES di sei diversi esperimenti

*P<0.05 rispetto ai ratti LF

Tabella 17

Respirazione mitocondriale in omogeniti di fegato di ratti rialimentati con diete ipo e iperlipidiche

	LF	HF-L	HF-S
Glutammato + malato			
Stato 3	7936±186	8898±231*	7249±253 [#]
Stato 4	632±33	698±24	646±21
RCR	12.7±0.5	12.8±0.4	11.2±0.2
Palmitoil-CoA + carnitina + malato			
Stato3	5966±280	6995±240*	5994±233 [#]
Stato4	663±27	734±31	760±25
RCR	9.3±0.5	9.6±0.4	7.9±0.3

I valori sono la media ± ES di sei diversi esperimenti e sono espressi come ng atomi di ossigeno x min⁻¹g⁻¹ di tessuto

LF: ratti alimentati con dieta ipolipidica, HF-L: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi saturi, HF-S: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi polinsaturi..

*P<0.05 rispetto ai ratti LF

[#]P<0.05 rispetto ai ratti HF-L

Tabella 18

Respirazione mitocondriale in mitocondri epatici isolati da ratti
Rialimentati con diete ipo- e iperlipidiche

	LF	HF-L	HF-S
Glutammato + malato			
Stato 3	101.1±4.5	122.6±3.6 [*]	107.2±4.2 [#]
Stato 4	13.2±0.9	13.7±0.4	11.6±0.6
RCR	8.1±0.3	9.0±0.4	9.9±0.7
Palmitoil-CoA + carnitina + malato			
Stato3	89.3±4.8	110.9±3.3 [*]	95.1±3.9 [#]
Stato4	16.0±0.8	16.5±0.6	16.5±0.9
RCR	5.8±0.2	6.6±0.3	5.9±0.3

I valori sono la media ±ES di sei diversi esperimenti e sono espressi come ng atomi di ossigeno x min⁻¹mg proteine⁻¹

LF: ratti alimentati con dieta ipolipidica, HF-L: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi saturi, HF-S: ratti alimentati con dieta ricca di acidi grassi polinsaturi..

* P<0.05 rispetto ai ratti LF

P<0.05 rispetto ai ratti HF-L

Discussione

Discussione disegno sperimentale 1: restrizione calorica

I risultati ottenuti dal primo disegno sperimentale indicano che gli effetti della restrizione calorica sono evidenti sia sulla massa sia sulla funzionalità del compartimento mitocondriale epatico, il principale sito cellulare coinvolto nel metabolismo energetico, cambiamenti che contribuiscono alla riduzione della spesa energetica dell'organismo "in toto".

Gli studi sui cambiamenti della spesa energetica in risposta ad una restrizione calorica hanno fornito dati discordanti: infatti, alcuni studi hanno riscontrato una diminuzione del metabolismo corporeo, mentre altri hanno evidenziato nessun cambiamento di tale parametro, in risposta a una riduzione dell'introito energetico [Ramsey, et al, 2000]. Uno dei motivi di tali discrepanze potrebbe derivare dalla difficoltà nel comparare i valori della spesa energetica in ratti con peso e composizione corporea differenti. Per questo motivo, nel mio primo lavoro ho utilizzato un disegno sperimentale che mi ha permesso di confrontare, alla fine del periodo sperimentale, non solo ratti della stessa età, ma anche ratti con massa e proteine corporee simili [Dullo et al, 2002, Crescenzo et al, 2003].

Una ulteriore conseguenza della restrizione calorica è la riduzione significativa dei lipidi corporei e dei livelli plasmatici di NEFA. Visto che l'accumulo di grasso corporeo e gli elevati livelli plasmatici di NEFA sono direttamente coinvolti nello sviluppo di disturbi metabolici come l'insulino-resistenza e il diabete, la diminuzione di questi parametri da me riscontrata

nei ratti FR mi permette di affermare che la restrizione calorica può essere considerata una appropriata terapia per la cura di queste patologie [*Virtue, Vidal-Puig, 2010; Boden & Shulman, 2002*]. In accordo con tutte queste osservazioni, i risultati ottenuti mostrano che la restrizione calorica induce un miglioramento della sensibilità all'insulina, come è indicato dai valori dell'indice HOMA che sono più bassi nei ratti FR rispetto ai controlli. Il miglioramento della sensibilità all'insulina è in accordo con i risultati di altri studi dove è stato dimostrato che la restrizione calorica migliora la sensibilità del recettore dell'insulina nel muscolo scheletrico [*Zhu et al, 2005*], che è il principale sito d'azione dell'insulina ed è quindi strettamente associato allo sviluppo dell'insulino-resistenza a livello dell'intero organismo [*Stannard & Johnson, 2003*]. I dati riportati indicano anche che la riduzione dei lipidi corporei ed i più bassi livelli di NEFA circolanti potrebbero giocare un ruolo negli effetti benefici della restrizione calorica, che estende la durata della vita in diverse specie [*Fontana et al, 2010; Cantó & Auwerx, 2009*].

Per valutare i cambiamenti nella capacità respiratoria mitocondriale epatica dovuti alla restrizione calorica, ho effettuato misure dello stato 3 e dello stato 4 della respirazione nei mitocondri epatici isolati. Da tali misure non si riscontrano variazioni significative né dello stato 3 né dello stato 4 della respirazione nei ratti FR rispetto ai controlli, con tutti i substrati utilizzati. In accordo con tali risultati, nei mitocondri epatici si evidenzia anche una diminuzione significativa della massima respirazione disaccoppiata,

indicando che la diminuzione dello stato 3 non è dovuta ad alterazione del sistema di sintesi dell' ATP, ovvero ad alterazioni dell'ATP sintetasi e/o del carrier ATP/ADP, ma ad una alterazione della catena di trasporto degli elettroni a partire dal complesso II [*Dumas et al, 2004*]. Inoltre, la misura della capacità respiratoria mitocondriale effettuata nell'omogenato, per tener conto di eventuali variazioni sia della massa sia della capacità respiratoria mitocondriale, ha evidenziato un aumento significativo dello stato 3 e dello stato 4 della respirazione con l'utilizzo di entrambi i substrati.

Dai risultati ottenuti dalla misura della respirazione negli omogenati e nei mitocondri epatici isolati si può ipotizzare, in accordo con altri studi, un aumento della massa proteica mitocondriale in seguito ad un periodo di restrizione calorica [*Lambert et al, 2004; López-Lluch et al, 2006*]. In accordo con tali risultati vi è un aumento del contenuto di citocromo C nei ratti FR rispetto ai controlli, per cui ne consegue una massa mitocondriale epatica incrementata nei ratti sottoposti a restrizione rispetto ai controlli. Tuttavia, quando le capacità respiratorie mitocondriali epatiche sono espresse per 100 g di peso corporeo, i valori di stato 4 e stato 3 ottenuti nei ratti FR sono minori rispetto ai controlli. Infatti, il fegato dei ratti FR ha un peso significativamente più basso rispetto ai due gruppi di controllo, sia come valore assoluto sia se espresso per 100 g di peso corporeo, indicando che la restrizione calorica determina una diminuzione del peso del fegato a prescindere dal blocco generale della crescita. Quindi, il fegato contribuisce

alla riduzione della spesa energetica totale corporea, indotta dalla restrizione calorica, per lo più attraverso la diminuzione del suo contributo alla massa corporea totale, che è bilanciata solo in parte dall'aumento della massa proteica mitocondriale a livello epatico. Tuttavia, l'aumento della massa mitocondriale è di fondamentale importanza per sostenere lo spostamento dal metabolismo dei carboidrati al metabolismo degli acidi grassi [Hagopian *et al*, 2003] e assicurare livelli di ATP necessari per sostenere l'aumento dei costi energetici indotti dalla aumentata gluconeogenesi tipica della restrizione calorica [Wallace *et al*, 2010].

Il grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa è un altro importante fattore in grado di influenzare la produzione mitocondriale di ATP. Dai risultati ottenuti non si evidenzia nessuna variazione significativa di tale parametro nei ratti FR rispetto ai controlli. Tuttavia, il grado di accoppiamento dipende anche dalle concentrazioni cellulari degli acidi grassi, che a loro volta sono legate alle corrispondenti concentrazioni nel plasma [Soboll & Stucki, 1985]. Visto che i valori dei livelli dei NEFA risultano significativamente più bassi nei ratti FR rispetto a quelli di controllo, il grado di accoppiamento potrebbe essere più alto nei ratti FR rispetto ai controlli. In conclusione, un più alto grado di accoppiamento mitocondriale si potrebbe tradurre in un risparmio energetico, poiché la quantità di substrati da ossidare, necessari a soddisfare le richieste energetiche della cellula, diminuirebbe.

Nella maggior parte delle cellule, i mitocondri rappresentano anche la principale fonte di specie reattive dell'ossigeno e sono un sito altamente esposto allo stress ossidativo [Brand, 2010]. Dai risultati ottenuti l'attività specifica dell'aconitasi mitocondriale, che è un marker del danno ossidativo dei ROS "in vivo" [Gardner, 2002], aumenta significativamente nei ratti FR rispetto ai controlli. Questo risultato potrebbe essere spiegato tenendo conto del fatto che i danni prodotti dai ROS dipendono sia dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno sia dalle difese antiossidanti. Infatti, l'attività mitocondriale della SOD, che è uno dei sistemi antiossidanti che opera nella cellula, aumenta significativamente nei ratti FR rispetto ai controlli. Pertanto, posso concludere che nel fegato l'aumento dell'attività della SOD potrebbe essere uno dei meccanismi alla base degli effetti benefici della restrizione calorica sullo stress ossidativo [Gredilla & Barja, 2005].

In conclusione, dai risultati attuali appare che il fegato contribuisce alla riduzione della spesa energetica in risposta alla restrizione calorica. Il risparmio energetico è il risultato della diminuzione del contributo del fegato al peso corporeo totale, mentre il tessuto è protetto dallo stress ossidativo, in accordo con i ben noti effetti protettivi della restrizione calorica.

Discussione disegno sperimentale 2: restrizione e rialimentazione isocalorica

In studi precedentemente condotti, in cui è stato utilizzato un modello animale di semidigiuno e rialimentazione, nel quale l'accelerata deposizione di grasso (recupero di grasso) è determinata unicamente dalla ridotta spesa energetica e non dall'iperfagia [Dulloo & Girardier, 1990], è stato dimostrato che la diminuita funzione e massa mitocondriale del muscolo scheletrico, specificamente nella popolazione mitocondriale subsarcolemmatica, contribuisce ad un'elevata efficienza per il recupero di grasso [Crescenzo et al, 2006].

Con il secondo disegno sperimentale focalizziamo l'attenzione ancora una volta sul fegato che potrebbe anche esso essere un importante sito per la diminuita termogenesi che sta alla base del recupero di grasso, suggerendo che l'energetica mitocondriale epatica alterata può essere più importante per un aumento dell'attività della lipogenesi de novo epatica che porta al recupero di grasso, piuttosto che per il meccanismo di conservazione dell'energia finalizzato al recupero di grasso.

I risultati sul bilancio energetico e sulla composizione corporea supportano fortemente l'importanza di un incremento adattativo dell'efficienza energetica nel recupero dei depositi di grasso corporeo, sebbene il miglioramento dell'efficienza energetica sia più pronunciato nella prima

settimana di rialimentazione rispetto alla seconda settimana di rialimentazione.

Un'ulteriore caratterizzazione metabolica dei ratti rialimentati è stata ottenuta, inoltre, misurando il VO_2 e la VCO_2 che permettono anche il calcolo del NPRQ. Dopo la prima e la seconda settimana di rialimentazione, sono stati trovati valori più bassi di VO_2 e di VCO_2 rispetto agli animali di controllo, mentre i valori del NPRQ sono significativamente aumentati. I valori più bassi di VO_2 e di VCO_2 osservati alla fine della seconda settimana di rialimentazione indicano che la ridotta spesa energetica degli animali rialimentati può persistere per oltre due settimane di rialimentazione in queste condizioni sperimentali. Inoltre, i risultati ottenuti dalla calorimetria indiretta relativi ai valori dell'NPRQ maggiori di 1 suggeriscono che l'aumentata deposizione di grasso tipica dei ratti rialimentati è, in parte, il risultato di una maggiore velocità della lipogenesi de novo rispetto ai controlli. Questo risultato è in accordo con l'ipotesi della redistribuzione del glucosio [Cettour-Rose et al, 2005], secondo la quale lo stato di insulino resistenza del muscolo scheletrico, trovato nei ratti rialimentati, è di centrale importanza nel risparmio del glucosio che può essere utilizzato dalla lipogenesi de novo. Inoltre, è stata dimostrata una maggiore attività della FAS – e perciò della lipogenesi de novo – nel tessuto adiposo bianco dei ratti rialimentati rispetto ai controlli [Cettour-Rose et al, 2005]. Questi risultati, insieme a quelli qui riportati che mostrano che

l'attività della FAS epatica è maggiore dopo una settimana di rialimentazione suggeriscono, data l'importanza del fegato come sito per la lipogenesi de novo, che questo tessuto può anche contribuire in modo significativo alla sintesi de novo dei lipidi di tutto l'organismo nei ratti rialimentati. È probabile che i lipidi sintetizzati nel fegato siano esportati al tessuto adiposo per il deposito, un'ipotesi che è coerente con i risultati che mostrano un aumento dell'attività della FAS epatica senza che ci sia un incremento del contenuto epatico di lipidi dopo una settimana di rialimentazione. È stato anche mostrato che dopo due settimane di rialimentazione l'attività della FAS epatica non risulta più elevata mentre persistono la ridotta spesa energetica e la maggiore lipogenesi de novo corporea. Appare quindi che sia il fegato che il tessuto adiposo contribuiscono alla lipogenesi de novo durante le prime fasi del recupero di grasso, mentre solo il tessuto adiposo rimane un importante sito per l'aumento della lipogenesi de novo nelle fasi tardive del recupero di grasso. I risultati da me ottenuti indicano anche una diminuzione significativa della massa mitocondriale epatica durante la prima settimana di rialimentazione. Questi cambiamenti nella massa mitocondriale epatica parallelamente a quelli trovati nel muscolo scheletrico nello stesso modello di recupero di grasso [Crescenzo et al, 2006], suggeriscono che la regolazione negativa della massa mitocondriale potrebbe essere una risposta generale dei tessuti alla privazione di energia. Cambiamenti opposti (cioè l'incremento) nella

massa mitocondriale epatica trovati in condizioni di eccessivo introito di energia, come un'alimentazione a lungo termine con una dieta ricca in grassi [*Crescenzo et al, 2008*], sottolineano una stretta correlazione tra la massa mitocondriale e la disponibilità di energia cellulare. Considerando i risultati che mostrano che la densità numerica mitocondriale epatica non è differente tra gli animali rialimentati e quelli di controllo [*Crescenzo et al, 2010*], il decremento nella massa mitocondriale epatica da me evidenziata potrebbe essere, quindi, il risultato di una regolazione negativa della sintesi proteica, che è un meccanismo che consuma energia, piuttosto che di una diminuzione della biogenesi mitocondriale.

Nel muscolo scheletrico, la diminuita massa proteica mitocondriale è accompagnata da una diminuzione della funzionalità respiratoria degli organelli, mentre a livello epatico, il potenziale impatto sull'utilizzo dell'energia cellulare della diminuita massa proteica mitocondriale, che si verifica dopo una settimana di rialimentazione, è contrastato da un concomitante aumento nelle capacità respiratorie specifiche. Infatti, la respirazione nello stato 3 è significativamente più alta nei mitocondri isolati. Nei mitocondri epatici, il trasportatore dei nucleotidi adeninici (ANT) e l'ATP sintasi non sono punti di controllo significativi per la respirazione supportata da glutammato e palmitoil-CoA [*Liverini et al, 1990*]. Di conseguenza, l'aumento dello stato 3 della respirazione evidenziato nei mitocondri epatici può essere attribuito a cambiamenti negli

stadi limitanti la velocità comuni all'ossidazione di entrambi i substrati, vale a dire, la capacità della catena respiratoria dal primo complesso in poi. L'aumentata capacità respiratoria trovata nei mitocondri isolati potrebbe avere rilevanza nella velocità di produzione dell'ATP, una tappa fondamentale e necessaria per supportare il meccanismo della lipogenesi epatica degli animali rialimentati.

Dai risultati della misura del grado di accoppiamento mitocondriale non si evidenziano differenze significative tra i ratti rialimentati per una e due settimane rispetto ai relativi controlli. Questi risultati, non mostrando variazioni nell'efficienza dei mitocondri epatici negli animali rialimentati, possono essere considerati rappresentativi delle condizioni "in vivo". Infatti, un altro importante fattore che può indurre un aumento dell'efficienza mitocondriale è la diminuzione nella concentrazione cellulare di NEFA.

Inoltre, per quanto riguarda lo stress ossidativo, non si osserva alcuna variazione dell'attività dell'aconitasi, indice del danno ossidativo. Dopo una settimana di rialimentazione, l'assenza di danno ossidativo è in accordo con l'aumento delle difese antiossidanti, infatti si ha un aumento dell'attività della SOD, e con l'aumento dell'attività della FAS epatica, via metabolica energeticamente molto dispendiosa. Questi risultati nel fegato si discostano da risultati precedentemente ottenuti sui mitocondri del muscolo

scheletrico, in cui si riscontra un aumento del danno ossidativo durante la rialimentazione [*Crescenzo et al, 2006*].

In conclusione, i risultati ottenuti in questo disegno sperimentale indicano che la deposizione lipidica tipica del periodo di rialimentazione dopo restrizione calorica è accompagnata da una marcata stimolazione della lipogenesi de novo anche in assenza di iperfagia. I miei risultati indicano, inoltre, che il fegato svolge un ruolo differente rispetto al muscolo scheletrico nel fenomeno del recupero di grasso. Infatti, il muscolo scheletrico, tramite riduzione della massa e dell'attività dei mitocondri subsarcolemmatici, contribuisce direttamente alla riduzione della termogenesi durante la rialimentazione. Al contrario, il fegato, grazie al mantenimento della capacità mitocondriale di produrre ATP, è direttamente impegnato nell'aumentata lipogenesi de novo che contribuisce alla eccessiva deposizione lipidica tipica della rialimentazione.

Discussione disegno sperimentale 3 restrizione e rialimentazione con diete ipo- e iperlipidiche

I risultati del terzo disegno sperimentale sul bilancio energetico sono in linea con risultati ottenuti precedentemente che suggeriscono che l'elevata efficienza energetica nel recupero di grasso è esasperata dalle diete iperlipidiche [Dulloo & Girardier, 1992; Crescenzo et al 2003], sebbene si ha un'entità più bassa del fenomeno quando le risorse di lipidi derivano dall'olio di cartamo anziché dal lardo [Dulloo et al, 1995]. Infatti, l'incremento dell'efficienza nel recupero di grasso e il decremento della spesa energetica trovati sono meno pronunciati durante il periodo di rialimentazione nei ratti rialimentati con dieta ricca di olio di cartamo rispetto ai ratti rialimentati con dieta ricca di lardo.

Un'ulteriore dannosa conseguenza della rialimentazione con diete iperlipidiche è l'induzione della steatosi epatica, un incremento del deposito di lipidi epatici che è noto essere una delle cause che provocano la steatoepatite non alcolica [Malaguarnera et al, 2009]. Questo incremento si verifica anche se la lipogenesi de novo è ridotta, come è mostrato dalla diminuzione delle attività della FAS epatica e dalla diminuzione di NPRQ in entrambi i gruppi rialimentati con diete iperlipidiche. Questo risultato è diverso da quello ottenuto coi ratti rialimentati con la dieta LF, nei quali non è stato trovato un aumento dei lipidi epatici, paragonati ai controlli,

nonostante questi ratti mostrano un'attività della FAS epatica e della lipogenesi de novo marcatamente più alta rispetto ai controlli. Un'osservazione interessante che deriva da questi dati è che la steatosi epatica sembra essere associata al contenuto lipidico della dieta piuttosto che con il manifestarsi della lipogenesi de novo. Inoltre, utilizzando le diete iperlipidiche durante la riabilitazione nutrizionale, un'alta percentuale di acidi grassi insaturi potrebbe essere utile a limitare la deposizione dei grassi a favore delle proteine, ma il problema della steatosi epatica rimarrebbe irrisolto.

I risultati mostrano che la rialimentazione con una dieta ricca di acidi grassi saturi come il lardo conduce ad un incremento nella capacità respiratoria dei mitocondri epatici, ma evidenziano anche che non sono osservati gli stessi cambiamenti quando il lardo è sostituito dall'olio di cartamo. Questo incremento, dovuto alla dieta ad alto contenuto di lardo, può essere individuato sia negli omogenati che nei mitocondri isolati e quindi non è dovuto a cambiamenti nella massa proteica mitocondriale. Questo può suggerire che i ratti rialimentati con la dieta ad alto contenuto in acidi grassi saturi possono regolare l'attività degli enzimi che catalizzano le reazioni limitanti per l'ossidazione dei lipidi e dei substrati NAD dipendenti. Infatti, l'effetto della dieta ad alto contenuto di lardo ad indurre l'incremento della capacità respiratoria mitocondriale è evidente sia quando si utilizzano substrati NAD-dipendenti sia quando si utilizzano substrati di natura

lipidica. Questo risultato è differente da quello precedentemente riportato su ratti alimentati ad libitum con una dieta iperlipidica [Iossa *et al*, 1999], in cui non vi sono differenze nella capacità ossidativa mitocondriale epatica dopo 2 settimane di trattamento dietetico. Quest'incremento nella capacità respiratoria mitocondriale durante la rialimentazione con la dieta ad alto contenuto di lardo può essere spiegato dagli aumentati livelli di NEFA plasmatici trovati nei ratti rialimentati con la dieta ad alto contenuto di lardo. Infatti, gli aumentati livelli di NEFA plasmatici potrebbero dare origine all'incremento dei livelli di NEFA intracellulari, e i NEFA sono ligandi naturali del PPAR α , (recettore attivato dal proliferatore perossisomiale) [Desvergne & Wahli, 1999]. Dato che il PPAR- α , che è espresso nel fegato, regola la trascrizione di geni che codificano gli enzimi coinvolti nella via metabolica dell'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale [Michalik & Wahli, 1999], si potrebbe pensare che gli aumentati livelli di NEFA plasmatici trovati in questi animali potrebbero stimolare la loro stessa ossidazione attivando la via di PPAR- α , nel fegato. Probabilmente questi cambiamenti rappresentano una risposta omeostatica per provare a compensare l'elevata disponibilità di lipidi nel fegato. Comunque questo meccanismo non riesce sempre ad eliminare gli acidi grassi, che vengono di conseguenza accumulati nel fegato e nel tessuto adiposo, probabilmente perché la loro ossidazione epatica è limitata dalle necessità di ATP cellulari. Tale ipotesi di un possibile collegamento tra gli

aumentati NEFA plasmatici e l'incremento della capacità ossidativa mitocondriale nei ratti rialimentati con la dieta ricca di lardo è in linea con i risultati dati dai ratti rialimentati con la dieta ad alto contenuto di olio di cartamo, nei quali non vi sono differenze di NEFA plasmatici rispetto ai ratti rialimentati con la dieta LF, e non ci sono differenze nemmeno per quanto riguarda la capacità respiratoria mitocondriale.

L'analisi del grado di accoppiamento mitocondriale mostra che non ci sono differenze significative tra i ratti rialimentati con dieta ricca di acidi grassi saturi e i ratti rialimentati con la dieta ipolipidica. Si manifesta, però, una diminuzione dell'efficienza a livello dei mitocondri epatici nei ratti rialimentati con dieta ricca di acidi grassi polinsaturi che potrebbe spiegare l'incremento meno pronunciato dell'efficienza del recupero di grasso di questi animali. I cambiamenti nella permeabilità della membrana mitocondriale interna possono essere collegati alla composizione della dieta. Infatti, l'aumentata percentuale di acidi grassi insaturi, e in particolare gli acidi grassi polinsaturi, nella membrana mitocondriale è stata correlata con una diminuzione dell'efficienza mitocondriale [Hulbert, *et al*, 2005]. Un aumentato inserimento di acido arachidonico nella membrana mitocondriale epatica, in ratti alimentati con diete ad alto contenuto di olio di semi di cartamo, può giocare un ruolo importante nel regolare l'efficienza mitocondriale, visto che è stato dimostrato che il contenuto di

acido arachidonico è correlato positivamente con il flusso protonico [*Brand et al, 1994*].

Per quanto riguarda lo stress ossidativo dai risultati non si osservano variazioni dell'attività dell'aconitasi, considerato come indice del danno ossidativo, nonostante ci sia un decremento dell'attività della SOD, che è considerato un indice delle difese antiossidanti.

In conclusione, i miei risultati indicano che la composizione in acidi grassi della dieta durante una rialimentazione influisce sul deposito di grasso corporeo durante il recupero di peso dopo una restrizione calorica. Infatti, l'esagerata soppressione della termogenesi che esaspera il recupero di grasso durante una dieta iperlipidica è in parte contrastata da una dieta ricca in acidi grassi ω -6, in parte grazie a uno spostamento nella ripartizione di energia dal grasso corporeo alle proteine, ed in parte grazie a un aumento della termogenesi al quale contribuisce una diminuzione dell'efficienza mitocondriale.

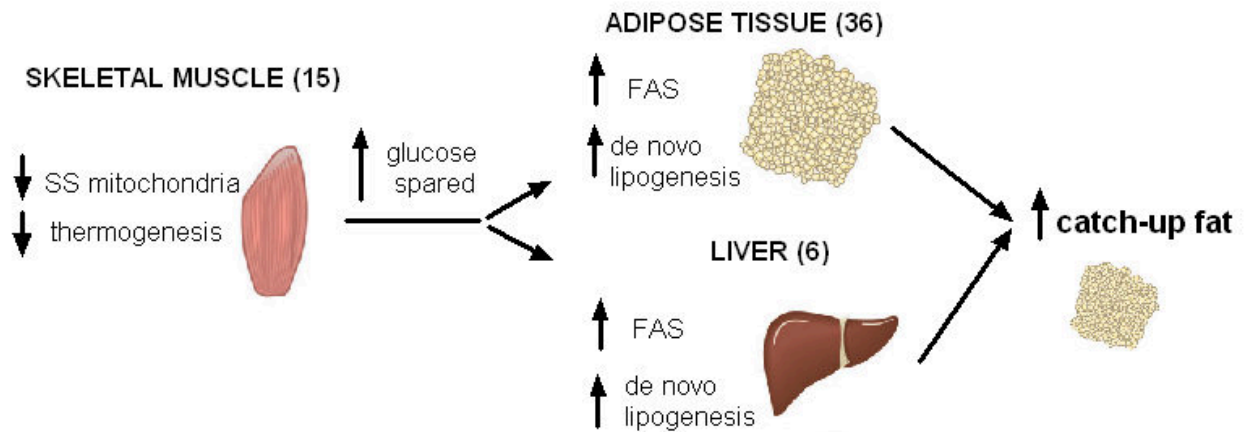
Conclusioni

I risultati di questo lavoro sul fegato, insieme ad altri precedentemente dimostrati sul muscolo scheletrico e sul tessuto adiposo sullo stesso modello animale di restrizione-rialimentazione, suggeriscono che questi organi e tessuti contribuiscono al recupero di grasso seguendo diverse vie metaboliche, come descritto in *figura 10*. Infatti durante la rialimentazione con dieta LF, il muscolo scheletrico, attraverso una riduzione della massa e dell'attività respiratoria dei mitocondri subsarcolemmatici, può contribuire direttamente alla soppressione della termogenesi che favorisce il risparmio di glucosio durante il recupero di grasso [Crescenzo et al 2006]. Il fegato e il tessuto adiposo, in contrasto, attraverso l'aumento dell'attività della FAS, possono contribuire al recupero di grasso corporeo aumentando la lipogenesi de novo [Crescenzo et al, 2010; Summermatter et al, 2009]. Per quanto riguarda il recupero di grasso con le diete iperlipidiche, nel muscolo scheletrico, la dieta ricca in lardo induce un ulteriore decremento nella via di segnalazione di PI3K e nell'attivazione dell'AMPK, ne consegue quindi un aggravamento sia della resistenza all'insulina sia della soppressione della termogenesi [Summermatter et al, 2008]. In contrasto, sembra che il ruolo del fegato nel fenomeno del recupero di grasso corporeo dipenda dalla composizione della dieta. Infatti, in questo lavoro è stato dimostrato che con la dieta ricca in acidi grassi $\omega 6$, il fegato è coinvolto in parte nel contrastare il recupero di grasso corporeo attraverso la diminuita efficienza mitocondriale. Resta da capire se simili diminuzioni dell'efficienza

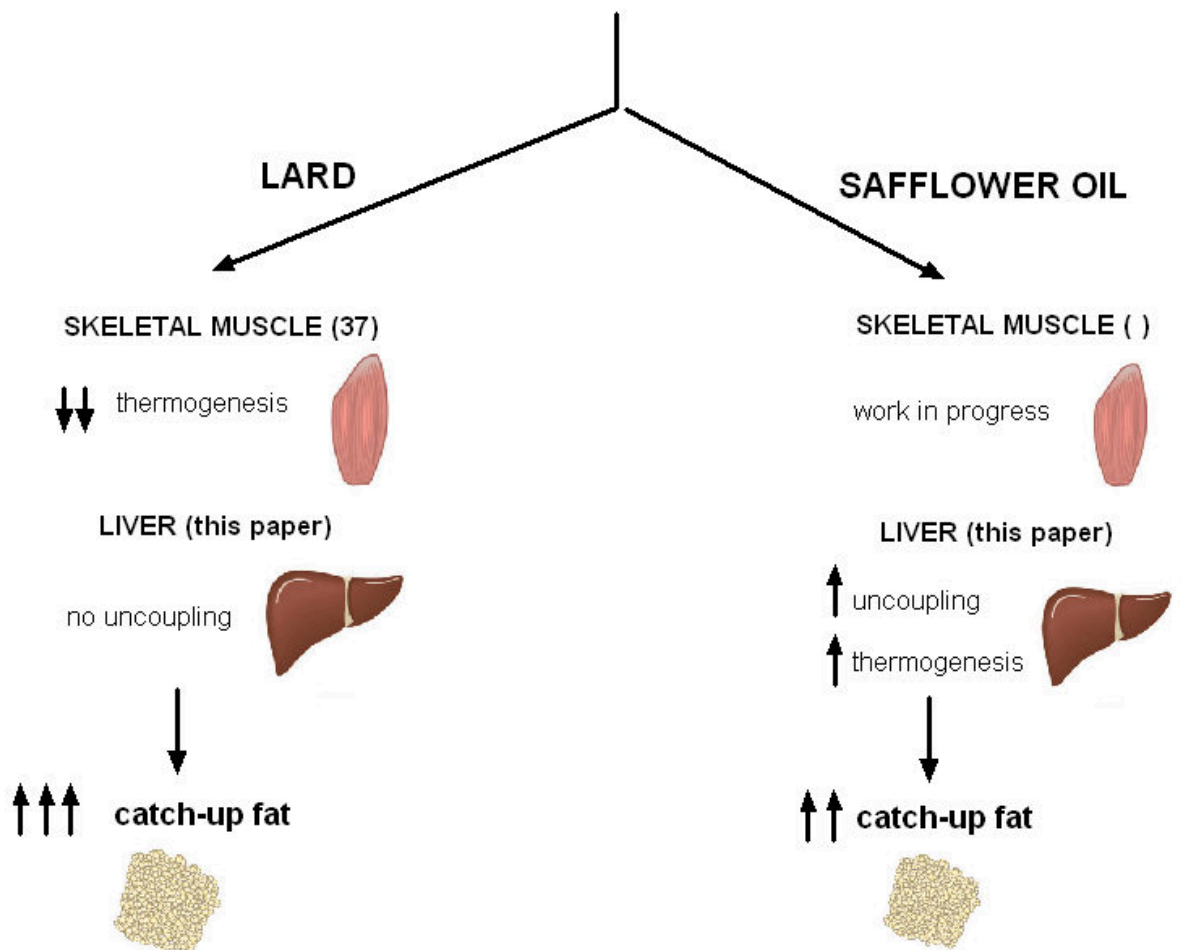
mitocondriale epatica possono anche verificarsi con diete iperlipidiche ricche in $\omega 3$ (acido α -linolenico) che riducono l'eccessivo deposito di grasso corporeo durante la rialimentazione [Yepuri et al, 2011]. La sostituzione di acidi grasso $\omega 6$ con $\omega 3$ potrebbe anche proteggere contro l'incremento dei lipidi nel fegato indotti da una dieta iperlipidica e ulteriori studi sono richiesti per la ricerca di diete ottimali per la riabilitazione nutrizionale nel recupero di peso che limitino contemporaneamente l'eccessiva deposizione di grasso nel tessuto adiposo e nel fegato.

Figura10

REFEEDING WITH LOW FAT DIET



REFEEDING WITH HIGH FAT DIET



Bibliografia

Bibliografia citata

- ❖ Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ et al. *The New Engl J Med* 353: 1802-1809 (2005).
- ❖ Barzilai N, Gabriely I. *J. Nutr*, 131: 903S-906S (2001).
- ❖ Blaak Ellen E. *Clin Endocrinol Metab*, 19: 391-403 (2005).
- ❖ Boden G, Shulman GI. *Eur J Clin Invest*, 32(3):14-23 (2002).
- ❖ Brand MD, Couture P, Hulbert AJ. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 108 (2):181-188 (1994).
- ❖ Brand MD. *Exp Gerontol*, 45: 466-472 (2010).
- ❖ Cacho J, Sevillano J, De Castro J, Herera E, Ramos MP. *Am J Physiol*, 295: E1269-E1276 (2008).
- ❖ Cairns C.B, Walther J, Harken A.H, Banerjee A. *Am. J. Physiol*, 274: R1376-R1383 (1998).
- ❖ Cantó C, Auwerx J. *Trends Endocrinol Metab*, 20(7):325-331 (2009).
- ❖ Cettour-Rose P, Samec S, Russell AP. et al. *Diabetes*, 54: 751–756 (2005).
- ❖ Cianfarani S, Germani D. & Branca F. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* ,81: F71–F73 (1999).
- ❖ Crescenzo R, Bianco F, Falcone I et al. *Metabolism*.59:1221–1230 (2010).
- ❖ Crescenzo R, Bianco F, Falcone I et al. *Obesity*, 16: 958-964 (2008).
- ❖ Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP et al. *Diabetes*, 55:2286–2293 (2006).
- ❖ Crescenzo R, Samec S, Antic V et al. *Diabetes*, 52:1090–1097 (2003).
- ❖ Desvergne B, Wahli W. *Endocr Rev*, 20:649–688 (1999).
- ❖ Drapier JC, Hibbs JBJ. *Meth Enzymol*, 269: 26-36 (1996).
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr*, 52: 415-420 (1990).
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Metabolism*, 41:1336–1342 (1992).
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J Montani JP. *Int J Obes*, 26 (suppl 2): s46-s57 (2002).
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J. *Am J Clin Nutr*, 68: 599-606 (1998).
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J. *Int J of Obes*, 20:393-405 (1996)

- ❖ Dulloo AG, Mensi N, Seydoux J, Girardier L. *Metabolism*;44:273–279 (1995).
- ❖ Dulloo AG. *Acta Physiol Scand*, 184: 295-307 (2005).
- ❖ Dulloo AG., Jacquet. J. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 (Suppl. 5): S22–S29 (2001).
- ❖ Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. *Biochim Biophys Acta*, 1670(2):126-131(2004).
- ❖ Elfhag K, Rössner S. *Obes Rev*, 6: 67-85 (2005).
- ❖ Elia M, Livesey G. *Am J Clin Nutr*, 47: 591-607 (1988).
- ❖ Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C & Barker DJP. *BMJ*, 318: 427–431 (1999).
- ❖ Flint DH, Allen RM. *Chem Rev*, 96: 2315-2334 (1993).
- ❖ Flohè L, Otting F. *J Meth Enzymol*, 105: 93-104 (1984).
- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS. *J Biol Chem*, 226: 497-510 (1957).
- ❖ Fontana L, Partridge L, Longo VD. *Science*, 328(5976):321-326 (2010).
- ❖ Foster GD, Waddwn TA, Kendrick ZV et al. *Med Sci sport Exer*, 27, 888-894 (1995).
- ❖ Fridovich I, Imlay JA. *J Biol Chem*, 266: 6957-65 (1991).
- ❖ Fridovich I. *Ann Rev Biochem*, 64: 97-112 (1995).
- ❖ Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL. *J Biol Chem*, 272: 25071-25076 (1997).
- ❖ Gardner PR. *Meth Enzymol*, 349: 9-16 (2002).
- ❖ Goglia F, Liverini G, Lanni A, Barletta A. *Mol and Cell Endocrinol*, 55:141-147 (1988).
- ❖ Gredilla R, Barja G. *Endocrinol*. 146(9): 3713-3717 (2005).
- ❖ Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. *Exp Gerontol*, 38(3):267-278 (2003).
- ❖ Hales CN, Barker DJP. *Br Med Bull*, 60: 5–20 (2001).
- ❖ HammP,Shekelle RB,StamlerJ. *Am J Epidemiol*, 129:312-318 (1989).
- ❖ Hartree EF. *Anal Biochem*, 48: 422-427 (1972).
- ❖ Hodd D. *Appl Physiol* 90:1137-1157 (2001).

- ❖ Holbrook TL, Barrett-Connor E, Wingard D. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 13: 723–729 (1989).
- ❖ Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Helse PL. *Biol Rev*, 80:155-169 (2005).
- ❖ Huxley RR, Shiell AW, Law CM. *J Hypertens*, 18: 815–831 (2000).
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23:1122–1128 (1999).
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, et al. *Int J Obes*, 26:65-72 (2002).
- ❖ Jornayvaz FR, Selz R, Tappy L, Theintz GE. *Metabolism*, 53: 847–851 (2004).
- ❖ Kensara OA, Wootton SA, Philips DI et al. *Am J Phys*, 291: E365- E371 (2006).
- ❖ Keys A, Brozek J, Henschel A, Mickelson O, Taylor HL. University of Minnesota Press, Minneapolis, MN (1950).
- ❖ Kovacs EMR, Westerterp-Plantenga MS. *Physiol. Behav*, 88: 371-381 (2006).
- ❖ Lambert AJ, Wang B, Yardley J, Edwards J, Merry BJ. *Exp Gerontol*, 39(3):289-295 (2004)
- ❖ Landsberg L, Saville ME, Young JB. *Am J Physiol*, 247: E181–E189 (1984).
- ❖ Landsberg L. *Q J Med* 61: 1081–1090 (1986).
- ❖ Lee IM, Paffenbarger RS. *JAMA* 268: 2045–2049 (1992).
- ❖ Levitt NS, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR. *J Clin Endocrinol Metabol*, 85: 4611–4618 (2000).
- ❖ Levy-Marchal C, Jaquet D, Czernichow P. *Semin Neonatol*, 9: 67–74 (2002).
- ❖ Lissner L, Bengtsson C, Lapidus L, Larsson B, Bengtsson B & Brownell K. In: P Bjorntorp & S Rossner (eds) *Obesity in Europe* 55–60. John Libbey, London, UK (1989).
- ❖ Lissner L, Odell PM, D’Agostino RB et al. *N Engl J Med*, 324: 1839–1844 (1991).
- ❖ Liverini G, Goglia F, Lanni A, Iossa S, Barletta A. *Comp Biochem Physiol*, 97B: 327-331 (1990).

- ❖ López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(6):1768-1773 (2006).
- ❖ Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. *J Mol Med*, 87:679–695 (2009).
- ❖ Michalik L, Wahli W. *Curr Opin Biotechnol*, 10:564–570 (1999).
- ❖ Neel JV, Weder AB, Julius S. *Perspect Biol Med*, 42: 44–75 (1998).
- ❖ Ong KKL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. *BMJ* 320: 967–971 (2000).
- ❖ Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. *Free Rad Biol & Med*, 29: 946-968 (2000).
- ❖ Reaven GM. *Ann Rev Nutr*. 2005; 25: 391-406.
- ❖ Roehrig KL, Alhed JB, *Anal Biochem*, 58:414-421 (1974).
- ❖ Rolfe DFS, Brown GC. *Physiol Rev*, 77: 731-758 (1997).
- ❖ Sawaya AL, Martins P, Hoffman D, Roberts SB. *Nutr Rev*, 61: 168–175 (2003).
- ❖ Soboll S, Stucki J. *Biochim. Biophys. Acta*, 807:245-254 (1985)
- ❖ Solinas G, Summermatter S, Mainieri D et al. *FEBS lett*, 557: 539-544 (2004).
- ❖ Soto N, Bazaes RA, Pena V et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 3645–3650 (2003).
- ❖ Stannard SR, Johnson NA. *J Physiol*, 554:595-607 (2003)
- ❖ Summermatter S, Mainieri D, Russel AP et al. *Int J of Obesity*, 30:S70 (2006).
- ❖ Summermatter S, Mainieri D, Russell AP et al. *FASEB J*, 22:774–785 (2008).
- ❖ Summermatter S, Marcelino H, Arsenijevic D et al. *Diabetes*, 58:2228–2237 (2009).
- ❖ Victora CG, Barros FC. *Int J Epidemiol*, 30: 217–220 (2001).
- ❖ Virtue S, Vidal-Puig A. *Biochim Biophys Acta*, 1801(3):338-349 (2010).
- ❖ Wallace DC, Fan W, Procaccio V. *Ann Rev Pathol*. 5: 297-348 (2010).
- ❖ Webber J, Macdonald IA. *Proc Nutr Soc*, 59: 397–404 (2000).
- ❖ Weyer C, Walford RL, Harper IT et al. *Am J Clin Nutr*, 72: 946–953 (2000).

- ❖ Yepuri G, Marcelino H, Shahkhalili Y et al. *Br J Nutr* 105:1750-1763 (2011).
- ❖ Young JB. Trends, *Endocrinol Metab* 13: 381–385 (2002).
- ❖ Zhu M, de Cabo R, Anson RM, Ingram DK, Lane MA. *Nutr*,21(3): 378-88 (2005)

Bibliografia consultata

- ❖ Cairns C.B, Walther J, Harken A.H, Banerjee A. *Am. J. Physiol.* 274:R1376-R1383(1998).
- ❖ Crescenzo R, Bianco F, Falcone I et al. *Metabolism* 59:1221–1230 (2010).
- ❖ Crescenzo R, Bianco F, Falcone I et al. *Obesity*, 16: 958-964 (2008).
- ❖ Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP et al. *Diabetes* 55, 2286-2293 (2006).
- ❖ Crescenzo R, Samec S, Antic V et al. *Diabetes*, 52:1090–1097 (2003).
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* 52, pp 415-420 (1990)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J Montani JP. *Int J of Obesity* 26,(suppl 2): s46-s57 (2002)
- ❖ Dulloo AG, Samec S. *Br J Nutr* 86:123-139 (2001).
- ❖ Dulloo AG. *Acta Physiol Scand*, 184: 295-307 (2005).
- ❖ Dulloo AG.& Jacquet J. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 (Suppl. 5): S22–S29 (2001).
- ❖ Elia M, Livesey G. *Am J Clin Nutr* 47: 591-607 (1988).
- ❖ Flint DH & Allen RM. *Chem Rev* 96: 2315-2334 (1993).
- ❖ Flohè L & Otting F. *J Meth Enzymol* 105: 93-104 (1984).
- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS. *J Biol Chem* 226: 497-510 (1957).
- ❖ Fridovich I & Imlay JA. *J Biol Chem* 266: 6957-65 (1991).
- ❖ Fridovich I. *An Rev Biochem* 64: 97-112 (1995).
- ❖ Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL. *J Biol Chem* 272: 25071-25076 (1997).
- ❖ Gardner PR. *J Meth Enzymol* 349: 9-16 (2002).
- ❖ Goglia F, Liverini G, Lanni A, Barletta A, *Molec and Cellul Endocrinology* 55: 141-147 (1988).
- ❖ Hartree EF. *Anal Biochem* 48: 422-427 (1972).
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, et al. *Int J Obes* 26, pp 65-72 (2002).
- ❖ Liverini G, Goglia F, Lanni A, Iossa S, Barletta A. *Comp Biochem Physiol*, 97B: 327-331 (1990).
- ❖ Yepuri G, Marcelino H, Shahkhalili Y et al. *Br J Nutr* 105:1750-1763 (2011).